Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21 EXPEDIENTE N° 03-38667

54 TITULO "FORMULACIONES DE COMBINACION DE ADYUVANTES"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/39 , A61P 31/00

71 SOLICITANTE WYETH HOLDINGS CORPORATION

DOMICILIO NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 REPRESENTANTE LEGAL JOSE ANTONIO LLORENTE
T P 10 764
Código 231

22 BOGOTA,D C 8 MAY 2003

(FORMA P 10)

TITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

03 038867 0

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Folios: 151
Trámite : 811 PCT-PATENT ...811 PRESENTAC

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① **SOLICITUD DE**

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

② **SOLICITANTE (71)**	Nombre **WYETH HOLDINGS CORPORATION** Dirección Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio New Jersey Estados Unidos de América Lugar de Constitución Teléfono 3264270 Fax 6069701 E-mail jlicco@lloredacamacho com	**IDENTIFICACION** C C ☐ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual Número
③ **REPRESENTANTE O APODERADO**	Nombre **JOSE ANTONIO LLOREDA** Dirección Calle 72 No 5-83 Piso 5º Bogotá- Colombia Teléfono 3264270 Fax 6069701 E-mail jlicco@lloredacamacho com	C C ☒ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual Número 17 159 681 TP 10 784
④ **INVENTOR(ES) (72)**	Nombre HAGEN Michael Dirección 12 Summit Oaks, Pittsford, NY 14534 Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos de América	

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No PCT/US01/46943 Fecha 08/11/01

Publicación Internacional No WO 02/38177 A2 Fecha 16/05/02

⑥ **Título (54)** **"FORMULACIONES DE COMBINACION DE ADYUVANTES"**

⑦ **Clasificación Internacional (51)** **A61K 39/39**, A61P 31/00, 31/18, 35/00, 37/00

⑧ **Prioridad** SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US y US	10/11/00 y 18/10/01	60/247,100 y 60/330 345

⑨ **Comprobante de Pago No** 02-86,504 y 03-25 768 **Fecha** 24-12-2002 y 11-04-2003

ANEXOS

(10)

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Documento de Representación Legal
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] Arte Final 12X12
- [ ] De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [x] Otros Reporte de Búsqueda Internacional y su traducción, Publicación con su traducción, Documento de Notificación de Cambio de Nombre del Solicitante con su traducción, Solicitud de Examen Preliminar, Dibujos y Listado de Secuencias

(11) **FIGURA CARACTERISTICA**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE JOSE ANTONIO LLOREDA

FIRMA

C C 17 159 681 Bta T P 10 784

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 02 - 86,504
FECHA DICIEMBRE 24 DE 2002

Industria y Com rcio
SUPERINTENDENCIA

==== C O N S I G N A C I O N ====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
LLOREDA Y CIA S A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3139931	24/12/2002	149,623,700 00

==== C O N C E P T O ====

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	378,000 00
		TOTAL $	378,000 00

SON TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion 1 [illegible] Folios 151
Fecha (AÑO) 2002-12-20 17 01 30
Tramite 811 PCT-PATENT 379 FASE NAC. 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 PT.ZS.CH DE NUEVAS CREACIONES

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic gov co
www sic gov co
Bogotá D C Colombia

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion 03038667 [illegible] Folios 151
Fecha (AMD): 2003-05-08 17:01 38
Tramite 011 PCT-PATENT 379 FASC MACI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS OPERACIONES
NIT 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE 03 - 25,768
FECHA ABRIL 11 DE 2003

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
LLOREDA Y CIA S A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	11724645	11/04/2003	664,800 00

C O N C E P T O

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	22,000 00
		TOTAL $	22,000 00

SON VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO

Se retiran folios

1 Extracto de publicación
5 Ficha de autor
6 Ficha Temática

13 10-2002

202052

7
4

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PARA ACCION ADICIONAL	ver Notificación de la Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como también, donde sea aplicable, el inciso 5 posterior
AM100449PCT		
No de Solicitud Internacional	**Fecha de presentación Internacional (día/mes/año):**	**Fecha de prioridad (la más reciente) (día/mes/año):**
PCT/US 01/46943	08/11/2001	10/11/2000
Solicitante		
AMERICAN CYANAMID COMPANY		

Este reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de la Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 18. Una copia está siendo transmitida a la Oficina Internacional

Este Reporte de Búsqueda Internacional consiste de un total de 6 hojas

[X] También está acompañado por una copia de cada documento de la técnica anterior citado en este reporte

1 Bases del Reporte

a Con respecto al idioma la búsqueda internacional se llevó a cabo en base a la solicitud Internacional en el idioma en el cual se presentó a menos que se indique de otra manera bajo este artículo

[ ] la búsqueda internacional se llevó a cabo en base a una traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23 1(b))

b Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional la búsqueda internacional se llevó a cabo en base al listado de secuencias

[X] contenido en la solicitud internacional en forma escrita

[X] presentado junto con la solicitud internacional en forma leíble por computadora

[ ] proporcionado subsecuentemente a la Autoridad en forma escrita

[ ] proporcionado subsecuentemente a la Autoridad en forma leíble por computadora

[ ] ha sido proporcionada la declaración que el listado de secuencias escrito subsecuentemente proporcionado no va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó

[ ] ha sido proporcionada la declaración que la información registrada en forma leíble por computadora es idéntica al listado de secuencias escrito

2 [X] Se encontró que ciertas reivindicaciones no son investigables (Ver el Cuadro I)

3 [ ] La unidad de la invención es deficiente (Ver el Cuadro II)

4 Con respecto al título

[X] el texto se aprueba como lo presentó el solicitante

[ ] esta Autoridad ha establecido que el texto se lee como sigue

5 Con respecto al resumen

[X] el texto se aprueba como lo presentó el solicitante

[ ] esta autoridad ha establecido el texto es, de acuerdo con la Regla 38.2(b), tal como aparece en el Cuadro III El solicitante puede dentro de un mes a partir de la fecha de envío por correo de este reporte de búsqueda internacional proporcionar comentarios a esta Autoridad

6 La figura de los dibujos que se va a publicar con el resumen es la Figura No

[ ] como lo sugirió el solicitante

[X] Ninguna de las figuras

[ ] porque al solicitante le faltó sugerir una figura

[ ] porque la figura caracteriza mejor la invención

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud Internacional
PCT/US 01/46943

Recuadro I Observaciones donde ciertas reivindicaciones no fueron localizadas (Continuación del punto 1 de la primera hoja).

Este reporte de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones.

1 [X] **Reivindicaciones Nos**
Debido a que se relacionan con el tema que no requiere que sea buscado por esta Autoridad, específicamente:

Aunque las reivindicaciones 29-50, 56-60 se dirigen a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la investigación se ha llevado a cabo y se ha basado en los efectos afirmados del compuesto/composición

2 [ ] **Reivindicaciones Nos**
debido a que se relacionan con las partes de la Solicitud Internacional que no cumple con los requerimientos preestablecidos a un grado tal que no se puede llevar a cabo la búsqueda internacional significativa, específicamente

3 [ ] **Reivindicaciones Nos**
Debido a que son reivindicaciones dependientes y no se asignan de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Recuadro II Observaciones donde la unidad de la invención es deficiente (Continuación del punto 2 de la primera hoja).

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones en esta solicitud internacional como sigue

1 [ ] Puesto que todas las tasas de búsqueda, adicionales requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda cubre todas las reivindicaciones buscables

2 [ ] Puesto que todas las reivindicaciones buscables podrían ser buscadas sin esfuerzo que justifique una tasa adicional esta Autoridad no solicitó el pago de cualquier tasa adicional

3 [ ] Puesto que únicamente algunas tasas de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos

4 [ ] Ninguna de las tasas de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante En consecuencia, este reporte de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada primero en las reivindicaciones se cubre por las reivindicaciones Nos 1-15 (parcialmente)

Comentario de protesta

[ ] Las tasas de búsqueda adicionales se acompañan por la protesta del solicitante

[ ] Ninguna protesta acompaña al pago de las tasas de búsqueda, adicionales

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No de solicitud internacional
PCT/US 01/46943

A CLASIFICACION DEL TEMA
IPC 7 A61K39/39 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00
A61P25/18 //A61K39/21, A61K39/00

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o a tanto la clasificación nacional como la IPC

B CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)
IPC 7 A61K

Documentación buscada diferente a la documentación mínima al grado que tales documentos están incluidos en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y en donde sea práctico términos de búsqueda utilizados)
EPO Internal, BIOSIS, MEDLINE

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS QUE SON RELEVANTES

Categoría*	Cita del documento con indicación, en donde sea apropiado de los pasajes relevantes	Pertinente para la reivindicación No.
Y	WO 98 50399 A (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC) 12 de Noviembre de 1998 (12-11-1998) Resumen página 2, línea 18 - línea 27 página 4 , línea 27 - página 5, línea 28 página 6, línea 7 - línea 8 ejemplo 20 página 76, línea 22 - página 88, línea 25 página 106, línea 5 - página 113 -/-	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56, 61-66

☒ Los documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C. ☒ Los miembros de familia de patentes se listan en el anexo

*categorías especiales de los documentos citados

"A" documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera que es de particular relevancia

"E" primer documento publicado en o después de la fecha de presentación internacional

"L" documento el cual puede arrojar dudas sobre la(s) reivindicación(es) de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)

"O" documento que se refiere a una descripción oral uso exhibición u otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de representación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad y no en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría fundamental de la invención

X* documento de relevancia particular la invención reclamada no puede ser considerada nueva o no se puede considerar que involucra una paso inventivo cuando el documento se toma solo

"Y" documento de particular relevancia no se puede considerar que la invención reclamada involucra un paso inventivo cuando el documento es combinado con uno o más de tales documentos tal combinación que es obvia para una persona experimentada en la técnica

"& documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación actual de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
25 de Septiembre de 2002	10/10/2002

Nombre y dirección de envío de la ISA	Funcionario autorizado
Oficina Europea de Patentes P B 5818 Patentlaan 2 NL 2280 HV Rijswijk Tel (+31 70) 340 2040 Tx 31 651 epo nl, Fax (+31 70) 340 3016	Noë, V

2

Forma PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No de solicitud internacional
PCT/US 01/46943

C (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
Y	WO 00 60084 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG, VINALS Y DE BASSOLS CARLOTA (BE), CORIX) 12 de Octubre DE 2000 (12-10-2000) página 22, línea 6 –página 23, línea 7 página 25, línea 7 – línea 19 página 26, línea 19 – línea 27 reivindicaciones 25, 26	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56, 61-66
Y	US 5 980 911 A (CORNER LEIGH AUSTIN Y COLABORADORES) 9 de Noviembre de 1999 (09-11-1999) el documento completo	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56, 61-66
Y	US 5 679 356 A (BONNEM ERIC M Y COLABORADORES) 21 de Octubre de 1997 (21-10-1997) citada en la solicitud el documento completo	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56, 61-66
Y	WO 98 57659 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG, BOON THIERRY (BE), SILLA SILVIA (BE), U) 23 de Diciembre de 1998 (23-12-1998) el documento completo	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56, 61-66
A	HAYNES B F Y COLABORADORES "HIV type 1 V3 region primer-induced antibody supression is overcome by administration of C4-V3 peptides as a polyvalent immunogen." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES ESTADOS UNIDOS FEBRERO DE 1995, vol 11, no 2, Febrero de 1995 (02-1995), páginas 211-221, XP001108967 ISSN 0889-2229 citada en la solicitud resumen tabla 1 -/-	14-16, 33-35, 43-45

2

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No de solicitud internacional
PCT/US 01/46943

C (Continuación) D CUMENT S QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
A	KURODA MARCELO J Y COLABORADORES "Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex " JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol, 187, no 9, 4 de Mayo de 1998 (04-05-1998), páginas, 1373-1381, XP002214739 ISSN 0022-1007 citada en la solicitud resumen columna 2, párrafo 3 —	14, 17, 33, 36, 43, 46
A	LIAO HUA-XIN Y COLABORADORES "Induction of antibodies in guinea pigs and rhesus monkeys against the human immunodeficiency virus type 1 envelope Neutralization of nonpathogenic and pathogenic primary isolate simian/human immunodeficiency virus strains " JOURNAL OF VIROLOGY, vol, 74, no 1, Enero de 2000 (01-2000), páginas 254-263, XP002214740 ISSN 0022-538X citada en la solicitud resumen página 255, columna 2, párrafo 1 —	14, 18, 19, 33, 37, 38 43, 47, 48
A	WO 99 27944 A (SCHENK DALE B, ATHENA NEUROSCIENCES INC (US)) 10 de Junio de 1999 (10-06-1999) citada en la solicitud resumen página 3, línea 18 – línea 28 página 14, línea 30 – línea 34 ——	52-55, 57-60

2

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información de miembros de familia de la patente

No de Solicitud Internacional
PCT/US 01/46943

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de Familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9850399 A	12-11-1998	US 6113918 A	05-09-2000
		AU 740663 B2	08-11-2001
		AU 7474798 A	27-11-1998
		BR 9809791 A	27-06-2000
		CN 1265112 T	30-08-2000
		EP 0983286 A1	08-03-2000
		HU 0004147 A2	28-04-2001
		JP 2002512623 T	23-04-2002
		NZ 500938 A	31-05-2002
		PL 343205 A1	30-07-2001
		US 6355257 B1	12-03-2002
		WO 9850399 A1	12-11-1998
		US 6303347 B1	16-10-2001
		US 2002048588 A1	25-04-2002
WO 0060084 A	12-10-2000	AU 4452900 A	23-10-2000
		EP 1169450 A1	09-01-2002
		WO 0060084 A1	12-10-2000
US 5980911 A	09-11-1999	AU 694774 B2	30-07-1998
		AU 2341195 A	29-11-1995
		WO 9530436 A1	16-11-1995
		CA 2189432 A1	16-11-1995
		EP 0755266 A1	29-01-1997
		NZ 284778 A	27-05-1998
US 5679356 A	21-10-1997	AU 4662393 A	31-01-1994
		CN 1091978 A	14-09-1994
		EP 0651656 A1	10-05-1995
		JP 7504683 T	25-05-1995
		MX 9304089 A1	31-01-1994
		WO 9401133 A1	20-01-1994
		ZA 9304890 A	14-04-1994
WO 9857659 A	23-12-1998	WO 9857659 A1	23-12-1998
		WO 9857660 A1	23-12-1998
		EP 1001808 A1	24-05-2000
		EP 0977589 A1	09-02-2000
		JP 2002504135 T	05-02-2002
		JP 2002504136 T	05-02-2002
		US 6375945 B1	23-04-2002
WO 9927944 A	10-06-1999	BG 104562 A	31-01-2001
		BR 9815357 A	24-10-2000
		CA 2312920 A1	10-06-1999
		CN 1281366 T	24-01-2001
		DE 1033996 T1	07-06-2001
		EE 200000379 A	16-04-2001
		EP 1033996 A1	13-09-2000
		HR 20000443 A1	31-10-2000
		HU 0100627 A2	28-06-2001
		JP 2002502802 T	29-01-2002
		NO 20002784 A	31-07-2000
		PL 342649 A1	18-06-2001
		TR 200001608 T2	23-07-2001
		WO 9927944 A1	10-06-1999
		AU 1706199 A	16-06-1999
		ZA 9810932 A	02-07-1999

A3

10

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION
Patent Law Department
Attn Gordan, Alan M
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
UNITED STATES OF AMERICA

Date of mailing (day/month/year) 10/10/2002	
Applicant's or agent's file reference AM100449PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 01/46943	International filing date (day/month/year) 08/11/2001
Applicant AMERICAN CYANAMID COMPANY	

1 [X] The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

RECEIVED
OCT 18 2002
By

2 [ ] The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith

3. [ ] With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

[ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

[ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made

4 Further action(s): The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication a notice of withdrawal of the international application or of the priority claim must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively before the completion of the technical preparations for international publication

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer D/INA HADNES/O

Form PCT/ISA/220 (July 1998)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English, if the language of the international application is French, the letter must be in French.

EMEDOCID: <XISA220NOEMP4 1 >

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new

(iv) the claim replaces one or more claims as filed,

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1 [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers, claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made].
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled, claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14, claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17, new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

BNSDOCID: <XISA220NOENF4 I >

46
13

PATENT COOPERATION TREA

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable item 5 below
AM100449PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US 01/ 46943	08/11/2001	10/11/2000

Applicant

AMERICAN CYANAMID COMPANY

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18 A copy is being transmitted to the International Bureau

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 **Basis of the report**

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed unless otherwise indicated under this item

[ ] the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b))

b With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application the international search was carried out on the basis of the sequence listing

[X] contained in the international application in written form

[X] filed together with the international application in computer readable form

[ ] furnished subsequently to this Authority in written form

[ ] furnished subsequently to this Authority in computer readble form

[ ] the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

[ ] the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2 [X] Certain claims were found unsearchable (See Box I)

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box II).

4 With regard to the title,

[X] the text is approved as submitted by the applicant.

[ ] the text has been established by this Authority to read as follows.

5. With regard to the abstract,

[X] the text is approved as submitted by the applicant.

[ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III The applicant may within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6 The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No _____

[ ] as suggested by the applicant. [X] None of the figures.

[ ] because the applicant failed to suggest a figure.

[ ] because this figure better characterizes the invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/46943

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons.

1 [X] Claims Nos.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority namely

Although claims 29-50,56-60 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition

2 [ ] Claims Nos
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically

3. [ ] Claims Nos.
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows.

1 [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2 [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.

4 [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/46943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/39 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00
A61P25/18 //A61K39/21,A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 50399 A (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC) 12 November 1998 (1998-11-12) abstract page 2, line 18 - line 27 page 4, line 27 -page 5, line 28 page 6, line 7 - line 8 example 20 page 76, line 22 -page 88, line 25 page 106, line 5 -page 113 -/—	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56,61-66

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents
- A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E earlier document but published on or after the international filing date
- L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O document referring to an oral disclosure use, exhibition or other means
- P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 September 2002	10/10/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Noë, V

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 60084 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ,VINALS Y DE BASSOLS CARLOTA (BE), CORIX) 12 October 2000 (2000-10-12) page 22, line 6 -page 23, line 7 page 25, line 7 - line 19 page 26, line 19 - line 27 claims 25,26	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56,61-66
Y	US 5 980 911 A (CORNER LEIGH AUSTIN ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) the whole document	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56,61-66
Y	US 5 679 356 A (BONNEM ERIC M ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) cited in the application the whole document	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56,61-66
Y	WO 98 57659 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ,BOON THIERRY (BE), SILLA SILVIA (BE), U) 23 December 1998 (1998-12-23) the whole document	1-13, 20-32, 39-42, 49-51, 56,61-66
A	HAYNES B F ET AL "HIV type 1 V3 region primer-induced antibody suppression is overcome by administration of C4-V3 peptides as a polyvalent immunogen " AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES UNITED STATES FEB 1995, vol 11, no 2, February 1995 (1995-02), pages 211-221, XP001108967 ISSN 0889-2229 cited in the application abstract table 1	14-16, 33-35, 43-45

-/-

2

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KURODA MARCELO J ET AL "Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex " JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol 187, no 9, 4 May 1998 (1998-05-04), pages 1373-1381, XP002214739 ISSN 0022-1007 cited in the application abstract column 2, paragraph 3	14,17, 33,36, 43,46
A	LIAO HUA-XIN ET AL "Induction of antibodies in guinea pigs and rhesus monkeys against the human immunodeficiency virus type 1 envelope Neutralization of nonpathogenic and pathogenic primary isolate simian/human immunodeficiency virus strains " JOURNAL OF VIROLOGY, vol 74, no 1, January 2000 (2000-01), pages 254-263, XP002214740 ISSN 0022-538X cited in the application abstract page 255, column 2, paragraph 1	14,18, 19,33, 37,38, 43,47,48
A	WO 99 27944 A (SCHENK DALE B ,ATHENA NEUROSCIENCES INC (US)) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application abstract page 3, line 18 - line 28 page 14, line 30 - line 34	52-55, 57-60

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

mation on patent family members

International Application No
PCT/US 01/46943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850399 A	12-11-1998	US 6113918 A	05-09-2000
		AU 740663 B2	08-11-2001
		AU 7474798 A	27-11-1998
		BR 9809791 A	27-06-2000
		CN 1265112 T	30-08-2000
		EP 0983286 A1	08-03-2000
		HU 0004147 A2	28-04-2001
		JP 2002512623 T	23-04-2002
		NZ 500938 A	31-05-2002
		PL 343205 A1	30-07-2001
		US 6355257 B1	12-03-2002
		WO 9850399 A1	12-11-1998
		US 6303347 B1	16-10-2001
		US 2002048588 A1	25-04-2002
WO 0060084 A	12-10-2000	AU 4452900 A	23-10-2000
		EP 1169450 A1	09-01-2002
		WO 0060084 A1	12-10-2000
US 5980911 A	09-11-1999	AU 694774 B2	30-07-1998
		AU 2341195 A	29-11-1995
		WO 9530436 A1	16-11-1995
		CA 2189432 A1	16-11-1995
		EP 0755266 A1	29-01-1997
		NZ 284778 A	27-05-1998
US 5679356 A	21-10-1997	AU 4662393 A	31-01-1994
		CN 1091978 A	14-09-1994
		EP 0651656 A1	10-05-1995
		JP 7504683 T	25-05-1995
		MX 9304089 A1	31-01-1994
		WO 9401133 A1	20-01-1994
		ZA 9304890 A	14-04-1994
WO 9857659 A	23-12-1998	WO 9857659 A1	23-12-1998
		WO 9857660 A1	23-12-1998
		EP 1001808 A1	24-05-2000
		EP 0977589 A1	09-02-2000
		JP 2002504135 T	05-02-2002
		JP 2002504136 T	05-02-2002
		US 6375945 B1	23-04-2002
WO 9927944 A	10-06-1999	BG 104562 A	31-01-2001
		BR 9815357 A	24-10-2000
		CA 2312920 A1	10-06-1999
		CN 1281366 T	24-01-2001
		DE 1033996 T1	07-06-2001
		EE 200000379 A	16-04-2001
		EP 1033996 A1	13-09-2000
		HR 20000443 A1	31-10-2000
		HU 0100627 A2	28-06-2001
		JP 2002502802 T	29-01-2002
		NO 20002784 A	31-07-2000
		PL 342649 A1	18-06-2001
		TR 200001608 T2	23-07-2001
		WO 9927944 A1	10-06-1999
		AU 1706199 A	16-06-1999
		ZA 9810932 A	02-07-1999

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial De La Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
16 de Mayo de 2002 (16.05 2002)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/38177 A2

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷ A61K 39/39, A61P 31/00, 31/18 35/00 37/00, 25/18 // A61K 39/21 39/00

(21) Número de Solicitud Internacional PCT/US01/46943

(22) Fecha de Presentación Internacional
8 de Noviembre de 2001 (08 11.2001)

(25) Idioma de Presentación Inglés

(26) Idioma de Publicación Inglés

(30) Fecha de Prioridad

60/247 100	10 de Noviembre de 2000 (10 11.2000)	US
60/330,345	18 de Octubre de 2001 (18 10 2001)	US

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados excepto US)* AMERICAN CYANAMID COMPANY [US/US] Una Corporación del Estado de Maine Five Giralda Farms Madison NJ 07940 (US)

(72) Inventor: e
(75) Inventor/Solicitante *(únicamente para US)* HAGEN, Michael [CA/US] 12 Summit Oaks Pittsford NY 14534 (US)

(74) Agentes GORDON, Alan, M y colaboradores American Home Products Corporation Departamento de Derecho Patentario, 5 Giralda Farms, Madison NJ 07940 (US).

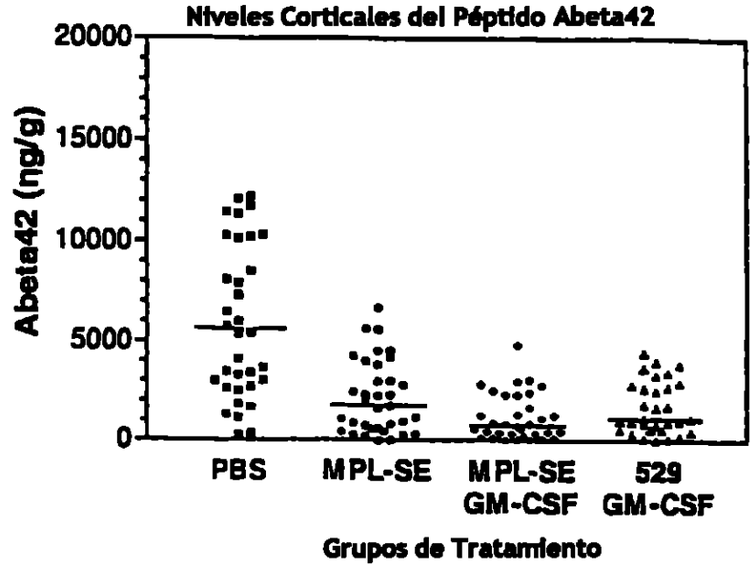
(81) Estados Designados. *(nacional)* AE AG AL AM AT AU AZ, BA BB BG, BR BY BZ, CA CH CN CO, CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR, HU ID IL, IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ, OM PH PL, PT RO RU SD SE SG SI SK, SL, TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ, VN YU ZA ZW

(84) Estados Designados *(regional)* Patente ARIPO (GH GM KE LS MW MZ, SD SL, SZ TZ, UG ZW) Patente euroasiática (AM AZ, BY KG KZ MD RU TJ TM), Patente europea (AT BE, CH CY DE DK, ES FI FR, GB GR IE IT LU MC NL, PT SE TR) Patente OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN, GQ GW ML, MR NE SN TD TG)

Publicada
— *sin reporte de búsqueda internacional y para ser vuelta a publicar en la recepción de ese reporte.*

Para los códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaciones que aparecen al principio de cada ejemplar regular de la gaceta del PCT

(54) Título FORMULACIONES DE COMBINACIÓN DE ADYUVANTES



(57) Resumen El uso de un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosamina, o un derivado o análogo del mismo, en combinación con una citocina o linfocina tal como un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos o interleucina 12 es útil como una combinación adyuvante en una composición antigénica para aumentar la respuesta inmune en un hospedero vertebrado a un antígeno seleccionado.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
16 May 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/38177 A2

(51) International Patent Classification⁷ A61K 39/39 A61P 31/00, 31/18, 35/00, 37/00, 25/18 // A61K 39/21, 39/00

(21) International Application Number: PCT/US01/46943

(22) International Filing Date:
8 November 2001 (08.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data
60/247,100 10 November 2000 (10.11.2000) US
60/330,345 18 October 2001 (18.10.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)* AMERICAN CYANAMID COMPANY [US/US] A Corporation of the State of Maine, Five Giralda Farms, Madison NJ 07940 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: HAGEN, Michael [CA/US] 12 Summit Oaks, Pittsford, NY 14534 (US).

(74) Agents: GORDON, Alan, M. et al. American Home Products Corporation, Patent Law Department, 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US)

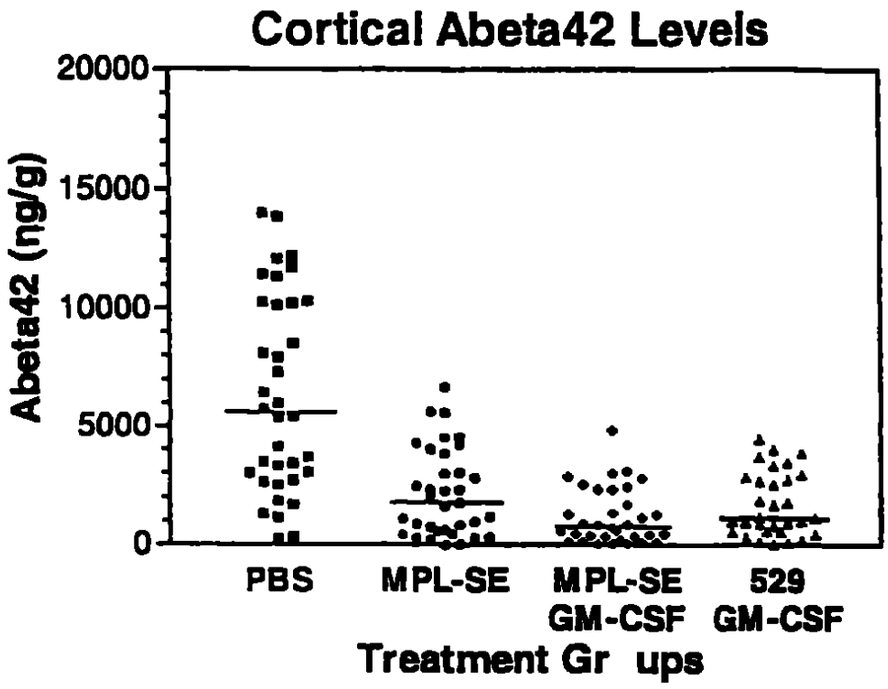
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published.
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

[Continued on next page]

(54) Title: ADJUVANT COMBINATION FORMULATIONS



(57) Abstract: The use of an aminoalkyl glucosamine phosphate compound, or a derivative or analog thereof, in combination with a cytokine or lymphokine such as granulocyte macrophage colony stimulating factor or interleukin-12, is useful as an adjuvant combination in an antigenic composition to enhance the immune response in a vertebrate host to a selected antigen.

WO 02/38177 A2

P24
21

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

S - 3 0 2002

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(c) and 61 1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

To:

WILEMAN, David Francis
Wyeth Laboratories
Huntercombe Lane South
Taplow Maidenhead Berks SL6 0PH
GRANDE BRETAGNE
U : K

Date of mailing (day/month/year) 17 SEP 2002

Applicant's or agent's file reference: AM100449 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/US01/46943	08 NOV 01	10 NOV 00

Applicant: American Cyanamid Company

1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

23 MAY 02

2. That date of receipt is:

☑ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61 1(b)).

☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(c)).

☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3 ☐ ATTENTION That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

☐ *(If applicable)* This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4 Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau

Name and mailing address of the IPEA/	Authorized officer
Assistant Commissioner for Patents Box PCT Washington, D.C. 20231 - Attn:RO/US	DR for Eric Simms
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703- 305 3761

Form PCT/IPEA/402 (July 98)

RECEIVED
26 SEP 2002
PATENTS DEPT.

CC PEARL RIVER

25
22

The demand must be filed direct[illegible]th the competent International Preliminary Exam[illegible] Authority or if two or more Authorities are with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line

IPEA/ EP

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated)

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

Applicant's or agent's file reference: AM100449PCT

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority date *(day/month/year)*
PCT/US01/46943	08November2001 (08/11/2001)	10November2000 (10/11/2000)

Title of invention
ADJUVANT COMBINATION FORMULATIONS

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

AMERICAN CYANAMID COMPANY
a corporation of the State of Maine
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
United States of America

Telephone No.: (845) 602-4636
Facsimile No.: (973) 683-2112
Teleprinter No.:
Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
UNITED STATES OF AMERICA	UNITED STATES OF AMERICA

Name and address: *(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

HAGEN Michael
12 Summit Oaks
Pittsford, New York 14534
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
CANADA	UNITED STATES OF AMERICA

Name and address: *(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.

Sheet No. 2

International application No.
PCT/US01/46943

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE, OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s) /common representative is hereby revoked.

☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier

Name and address: *(Family name followed by given name, for a legal entity, full official The address must include postal code and name of country.)*

WILEMAN, David Francis, CONNELLY Michael John;
MANNION, Sally Kim, TALBOTT, Dawn Jacqueline
c/o WYETH LABORATORIES
Huntercombe Lane South
Taplow, Maidenhead
Berkshire SL60PH
United Kingdom

Telephone No.
(0628) 604377

Facsimile No.
(0628) 799098

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments.*

1 The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed.

the description	☒	as originally filed
	☐	as amended under Article 34
the claims	☒	as originally filed
	☐	as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
	☐	as amended under Article 34
the drawings	☒	as originally filed
	☐	as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3 ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69 1(d)). *(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)*

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination ENGLISH

☒ which is the language in which the international application was filed.

☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.

☐ which is the language of publication of the international application.

☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The applicant hereby elects all eligible States *(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)*

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Sheet No. 3

International application No.
PCT/US01/46943

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination.		For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1 translation of international application	sheets	☐	☐
2. amendments under Article 34	sheets	☐	☐
3 copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	sheets	☐	☐
4 copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	sheets	☐	☐
5 letter	sheets	☐	☐
6 other *(specify)*	sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1 ☒ fee calculation sheet
2. ☐ original separate power of attorney
3 ☐ original general power of attorney
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
5 ☐ statement explaining lack of signature
6. ☐ sequence listing in computer readable form
7 ☐ other *(specify)*:

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Alan M Gordon
Agent for Applicants

For International Preliminary Examining Authority use only

1 Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b)

3 ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply ☐ The applicant has been informed accordingly

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on

~~25~~
25

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT
NOTIFICACION DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92bis 1 del PCT e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para

GORDON, Alan M
Wyeth
Departamento de Derecho Patentario
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Fecha de Envío (día/mes/año) 26 de Febrero de 2003 (26 02 03)	
Referencia del registro del solicitante o mandatario AM100449PCT	**NOTIFICACION IMPORTANTE**
Solicitud Internacional No PCT/US01/46943	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 08 de Noviembre de 2001 (08 11 01)

1 Las siguientes indicaciones aparecen en el registro que se refiere a
☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el mandatario ☐ el representante común

Nombre y Dirección

AMERICAN CYANAMID COMPANY
Una Corporación del Estado de Maine
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
Estados Unidos de América

Estado de Nacionalidad US	Estado de Residencia US
No de Teléfono	
No. de Facsímil	
No de Teleimpresor	

2 La Oficina Internacional notifica al solicitante, por la presente, que se ha registrado el siguiente cambio que se refiere a
☐ la persona ☒ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

WYETH HOLDINGS CORPORATION
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
Estados Unidos de América

Estado de Nacionalidad US	Estado de Residencia US
No. de Teléfono	
No de Facsímil	
No de Teleimpresor	

3 Observaciones Adicionales, si es necesario

4. Una copia de esta notificación se ha enviado a

☒ la Oficina de recepción
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional
☒ la Autoridad del Examen Preliminar Internacional
☐ las Oficinas designadas relacionadas
☒ las Oficinas elegidas relacionadas
☐ otras.

La Oficina Internacional de la WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Ginebra 20, Suiza No. de Facsímil (41-22) 740 14 35	Funcionario autorizado Carine SEVILLANO (Fax 022 338 87 40) No de Teléfono (41-22) 338 3254

Forma PCT/IB/306 (Marzo de 1994)
005484306

24
4 26

PATENT COOPERATION TREATY

CC. TAPLOW

CC: PEARL RIVER

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis 1 and Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

RECEIVED
MAR 1 3 2003

GORDON, Alan, M
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

Date of mailing (day/month/year)	
26 February 2003 (26 02 03)	
Applicant's or agent's file reference	**IMPORTANT NOTIFICATION**
AM100449PCT	
International application No.	**International filing date (day/month/year)**
PCT/US01/46943	08 November 2001 (08 11 01)

1 The following indications appeared on record concerning

[X] the applicant [ ] the inventor [ ] the agent [ ] the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
AMERICAN CYANAMID COMPANY A Corporation of the State of Maine Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	US	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning

[ ] the person [X] the name [ ] the address [ ] the nationality [ ] the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
WYETH HOLDINGS CORPORATION Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America CL 3/14/03	US	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary

4. A copy of this notification has been sent to

[X] the receiving Office
[ ] the International Searching Authority
[X] the International Preliminary Examining Authority
[ ] the designated Offices concerned
[X] the elected Offices concerned
[ ] other

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Carine SEVILLANO (Fax 022 338 8740)
Facsimile No. (41-22) 740 14 35	Telephone No. (41-22) 338 83 38

30

27

FORMULACIONES DE COMBINACIÓN DE ADYUVANTES

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

El uso de un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosamina, o un derivado o análogo del mismo, en combinación con una citocina o linfocina tal como un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos o interleucina-12, es útil como una combinación adyuvante en una composición antigénica para aumentar la respuesta inmune en un hospedero vertebrado a un antígeno seleccionado

FORMULACIONES DE COMBINACIÓN DE ADYUVANTES

Campo de la Invención

Esta invención se refiere al uso de un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosamina, o un derivado o análogo del mismo, en combinación con una citocina o linfocina, en particular un factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos o interleucina-12, como una formulación de adyuvantes en una composición antigénica o inmunogénica para aumentar la respuesta inmune a un antígeno seleccionado en un hospedero vertebrado

Antecedentes de la Invención

El sistema inmune utiliza una variedad de mecanismos para atacar agentes patógenos Sin embargo, no todos estos mecanismos son activados necesariamente después de la inmunización La inmunidad protectora inducida por la inmunización es dependiente de la capacidad de la composición inmunogénica para producir la respuesta inmune apropiada para resistir o eliminar el agente patógeno Dependiendo del agente patógeno, esto puede requerir una respuesta inmune mediada por células y/o humoral

El presente paradigma para el papel de las células T auxiliares en el sistema inmune es que las células T pueden ser separadas en subconjuntos en base a las citocinas que éstas producen, y que el distinto perfil de citocinas observado en estas

células determina su función Este modelo de células T incluye dos subconjuntos principales células TH-1 que producen interleucina-2 (IL-2) e interferón gama, el cual aumenta las respuestas inmunes tanto celulares como humorales (anticuerpos), y células TH-2 que producen interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-10 (IL-4, IL-5 e IL-10, respectivamente), que aumentan las respuestas inmunes, humorales (entrada 1 de la bibliografía)

Frecuentemente es deseable aumentar la potencia inmunogénica de un antígeno a fin de obtener una respuesta inmune más fuerte en el organismo que es inmunizado y fortalecer la resistencia del hospedero al agente que lleva el antígeno En algunas situaciones, es deseable cambiar la respuesta inmune de una respuesta predominantemente humoral (TH-2) a una respuesta celular (TH-1) y humoral (TH-2) más balanceada

Una respuesta celular involucra la generación de una respuesta de CTL CD8+ (linfocitos T citotóxicos) Esta respuesta es deseable para el desarrollo de composiciones inmunogénicas contra agentes patógenos intracelulares La protección contra una variedad de agentes patógenos requiere respuestas fuertes de las mucosas, altos títulos en el suero, inducción de CTL y respuestas celulares, vigorosas Estas respuestas no han sido proporcionadas por la mayoría de preparaciones de antígenos, inclusive las composiciones inmunogénicas de subunidades convencionales Entre estos agentes

patógenos está el virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés)

De esta manera, existe la necesidad de desarrollar formulaciones de composiciones antigénicas que sean capaces de generar respuestas inmunes tanto humorales como celulares en un hospedero vertebrado

Breve Descripción de la Invención

Por consiguiente, es un objetivo de esta invención utilizar formulaciones de combinación de adyuvantes en composiciones antigénicas que contienen un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosalina (AGP), o un derivado o análogo del mismo, combinado con una citocina o linfocina, en particular un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos particular (GM-CSF, por sus siglas en inglés) o interleucina-12 (IL-12), o un agonista o antagonista para la citocina o linfocina En particular, el AGP es 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosida) de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo, el cual también es conocido como 529 (antiguamente conocido como RC529)

Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno La formulación adyuvante de esta invención se administra con un antígeno

seleccionado en una composición antigénica o inmunogénica Las composiciones antigénicas de esta invención aumentan la respuesta inmune a ese antígeno seleccionado en un hospedero vertebrado El antígeno seleccionado puede ser un polipéptido, péptido o fragmento derivado (1) de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, o (2) de una célula de cáncer o célula de tumor, o (3) de un alérgeno para interferir con la producción de IgE para moderar las respuestas alérgicas al alérgeno, o (4) de una proteína precursora amiloidea para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por una deposición amiloidea en un hospedero vertebrado En una modalidad de la invención, el antígeno seleccionado es de HIV El antígeno de HIV seleccionado puede ser una proteína, polipéptido, péptido o fragmento de la proteína de HIV En una modalidad particular de la invención, el antígeno de HIV es un péptido específico En otra modalidad de la invención, el antígeno seleccionado es el péptido β-amiloideo (también referido como péptido Aβ), el cual es un fragmento interno, 39-43 aminoácidos de la proteína precursora amiloidea (APP, por sus siglas en inglés), la cual es generada mediante el procesamiento de la APP por las encimas β- y γ- secretasa

El AGP puede estar presente como una solución acuosa, o como una emulsión estabilizada de aceite en agua (emulsión estable o SE (por sus siglas en inglés)) En una modalidad preferida de la invención, la emulsión de aceite en agua contiene

escualeno, glicerol y fosfatidil-colina En la formulación SE, el ACG se mezcla con la citocina o linfocina para formar la composición antigénica antes de la administración La citocina o linfocina no es requerida para introducir la emulsión En una modalidad preferida de la invención, el AGP está en la forma de SE La composición antigénica puede comprender además un diluyente o portador

La invención también se dirige a métodos para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado (1) de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico para producir la respuesta inmune de un hospedero vertebrado, o (2) de un antígeno de cáncer o antígeno asociado con tumores de una célula de cáncer o célula de tumor para producir un efecto anticancerígeno terapéutico o profiláctico en un hospedero vertebrado, o (3) de un alérgeno para interferir con la producción de IgE para moderar las respuestas alérgicas al alérgeno, o (4) de una molécula o porción de la misma que representa aquellas producidas por un hospedero (una molécula misma) de una manera indeseada, una cantidad o ubicación para reducir ese efecto indeseado, mediante la inclusión de una cantidad adyuvante, efectiva de una combinación de una citocina o linfocina, en particular un AGP con GM-CSF o IL-12, o un antagonista o agonista para la citocina o linfocina

La invención también se dirige a métodos para incrementar la capacidad de una composición

antigénica que contiene un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico para producir linfocitos T citotóxicos en un hospedero vertebrado al incluir una cantidad adyuvante, efectiva de una combinación de una citocina o linfocina, en particular un AGP con GM-CSF o IL-12, o un antagonista o agonista para la citocina o linfocina

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 representa los títulos geométricos promedio de los anticuerpos para el péptido Aβ1-42 en ratones transgénicos inmunizados como sigue grupo 1 - péptido Aβ1-42 más PBS (no mostrados), grupo 2 - Aβ1-42 más MPL^{MR}-SE-(cuadros), grupo 3 - péptido Aβ1-42 más MPL^{MR}-SE y GM-CSF (triángulos), grupo 4 - péptido Aβ1-42 más 529-SE y GM-CSF (triángulos invertidos) (cuyo título es "Comparación de GMT's de Formulaciones de GM-CSF a MPL-SE sola")

La figura 2 representa los niveles corticales del péptido Aβ total en ratones transgénicos inmunizados con los cuatro grupos descritos para la figura 1 (cuyo título es "Niveles Corticales del Péptido Abeta total")

La figura 3 representa los niveles corticales del péptido Aβ1-42 en ratones transgénicos inmunizados con los cuatro grupos descritos para la figura 1 (cuyo título es "Niveles Corticales del Péptido Abeta42")

La figura 4 representa la carga amiloidea de la corteza frontal en ratones transgénicos inmunizados con los cuatro grupos descritos para la figura 1 (cuyo título es "Carga Amiloidea en la Corteza Frontal")

La figura 5 representa la carga neurítica de la corteza frontal en ratones transgénicos inmunizados con los cuatro grupos descritos para la figura 1 (cuyo título es "Carga Nefrítica en la Corteza Frontal")

La figura 6 representa los niveles de astrocitosis de la corteza retroesplenial en ratones transgénicos inmunizados con los cuatro grupos descritos para la figura 1 (cuyo título es "Valores Promedio de Astrocitosis Cortical Retroesplenial")

La figura 7 representa los títulos de anticuerpos geométricos, promedio de IgG específica para el péptido de HIV C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en el suero en dos grupos de macacos cynomologous (cuatro animales por grupo) Los animales del grupo 1 fueron inmunizados por la ruta intranasal con el péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ solo Los animales del grupo 2 fueron inmunizados intramuscularmente con el péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ formulado con 529-SE y GM-CSF Las flechas indican las inmunizaciones en las semanas 0, 4, 8, 18 y 23 (cuyo título es "Título en el Suero de IgG Ab Específica para el Péptido C4(E9V)-V3")

La figura 8 representa los títulos de anticuerpos geométricos promedio, en muestras de irrigación cervicovaginal de los mismos animales

descritos para la figura 7 (cuyo título es "IgG Específica para C4-V3 en Muestras de Lavado Cervicovaginal")

La figura 9 representa los títulos de anticuerpos geométricos promedio, en muestras de lavado nasal de los mismos animales descritos para la figura 7 (cuyo título es "IgG Específica para C4-V3 en Muestras de Lavado Nasal")

Descripción Detallada de la Invención

Los adyuvantes, citocinas y linfocinas son compuestos moduladores de inmunidad que tienen la capacidad para aumentar y guiar el desarrollo y perfil de respuestas inmunes contra diversos antígenos que son pobremente inmunogénicos por sí mismos La selección apropiada de adyuvantes, citocinas y linfocinas puede inducir buenas respuestas inmunes ya sea humorales como celulares que no podrían desarrollarse en la ausencia del adyuvante, citocina y linfocina En particular, los adyuvantes, citocinas y linfocinas tienen efectos significantes en el aumento de la respuesta inmune a antígenos de subunidades y péptidos en composiciones inmunogénicas Su actividad estimuladora también es benéfica para el desarrollo de respuestas inmunes específicas para antígenos dirigidas contra antígenos de proteína Para una variedad de antígenos que requieren fuertes respuestas de las mucosas, altos títulos en el suero, inducción de CTL y respuestas celulares vigorosas, las combinaciones de adyuvantes

y citocinas/linfocinas proporcionan estímulos que no son proporcionados por la mayoría de preparaciones de antígenos

Numerosos estudios han evaluado diferentes formulaciones de adyuvantes en modelos animales, pero el alumbre (hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio) es actualmente el único adyuvante autorizado para el uso difundido en humanos Otro adyuvante es Stimulon^{MR} QS-21 (QS-21) (Antigenics Inc Framingham, MA (2)) Un grupo de adyuvantes, emulsiones estables, que consisten de diversas combinaciones de agua en aceite o aceite en agua, ha recibido atención considerable por su habilidad para aumentar la potencia de la inmunidad Estas formulaciones consisten generalmente de diversas combinaciones de aceites metabolizables o inertes que actúan para estabilizar y depositar el antígeno en el sitio de inyección Uno de tales adyuvantes es el adyuvante incompleto de Freund (IFA), el cual incluye aceite mineral, agua y un agente emulsionante El adyuvante completo de Freund (CFA) es IFA más micobacterias neutralizadas con calor Un problema particular en el uso de estos tipos de adyuvantes ha sido la irritación asociada con el sitio de la inyección, frecuentemente el resultado de infiltraciones de células mononucleares que causan lesiones granulomatosas Por lo tanto, otros compuestos y formulaciones están siendo investigados como adyuvantes potenciales

Un grupo de tales compuestos son los

compuestos de fosfato aminoalquil-glucosamina (AGPs), los cuales son descritos en la patente norteamericana número 6,113,918, por ejemplo en la columna 2, línea 14-columna 3, línea 38, la cual es incorporada por este acto a manera de referencia (3) Los AGPs tienen un grupo aminoalquilo (aglicon), el cual está enlazado por un glicósido a una 2-desoxi-2-amino-α-D-glucopiranosa (glucosamina) para formar la estructura básica Los sustituyentes adicionales incluyen la fosforilación del carbono 4 o 6 en el anillo de glucosamina y tres residuos 3-alcanoiloxialcanoilo

Uno de tales AGP es el compuesto designado 529 (cuyo nombre químico completo es 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosida) de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo, el cual es producido por Corixa (Hamilton, MT)

Corixa también ha formulado una formulación de aceite en agua metabolizable la cual, cuando se combina con 529, da por resultado la formación de una emulsión estabilizada designada 529-SE La emulsión estabilizada es generada a través de la microfluidización de 529 con aceite de escualeno, glicerol y fosfatidil-colina La formulación actual es una emulsión microfluidizada de calidad GMP Las emulsiones que contienen 1% de aceite (aunque se pueden utilizar otras concentraciones) se describen en los experimentos posteriormente

La 529-SE no dio por resultado una patología

de tejido grueso discernible cuando se administró por la ruta subcutánea en ratones Balb/c o Swiss-Webster Una emulsión estabilizada que contiene los mismos componentes, pero sin 529 también fue generada para propósitos comparativos Específicamente, la inmunización subcutánea con una versión de 39 aminoácidos con la cisteina suprimida (-Cys) de un péptido de HIV de 40 aminoácidos T1SP10MN(A) (el cual carece del residuo de cisteina en el número de aminoácido 17 del péptido de 40 aminoácidos (+Cys)), o con Aβ1-42 (un fragmento interno de 42 aminoácidos de APP), cada uno formulado con la combinación de adyuvantes 529-SE y GM-CSF, no dio por resultado inflamación, rojez, hinchazón o endurecimiento dicernibles

Dentro del alcance de esta invención también están los derivados y análogos de 529 y otros AGPs Tales compuestos incluyen, pero no está limitados a los compuestos descritos en la patente norteamericana número 6,113,918 (3)

La incorporación de citocinas y linfocinas en las composiciones inmunogénicas ha sido prometedora para la expansión y aumento del potencial de composiciones inmunogénicas (4) Se ha demostrado que la citocina interleucina-12 (IL-12) evoca y aumenta la inmunidad mediada por células, a través de un cambio en la expansión del subconjunto de células T auxiliares hacia un perfil de citocinas Th1 (es decir, a la subclase IgG2 en el modelo de ratón) (5-7) En los ratones, se ha mostrado que la IL-12 de

murino recombinante aumenta un perfil de respuesta inmune dominado por Th1 (4)

IL-12 es producida por una variedad de células presentadoras de antígenos, principalmente macrófagos y monocitos Es un elemento crítico en la inducción de células TH1 de células T naturales o no sometidas a experimentación Se ha mostrado que la producción de IL-12 o la capacidad para responder a esto es crítica en el desarrollo de respuestas similares a TH1 protectoras, por ejemplo, durante las infecciones parasíticas, más notablemente Leishmaniasis (8), así como también en el aumento de la respuesta inmune mediada por células a un antígeno de una bacteria o virus patogénico (9) o de una célula de cáncer (10) Los efectos de IL-12 son mediados en gran parte por el interferón-gama producido por las células NK y células auxiliares T El interferón gama es crítico para la inducción de anticuerpos de IgG2a para los antígenos de proteína dependientes de T (11) y las respuestas de IgG3 a los antígenos independientes de T (12) La IL-12, originalmente llamada factor estimulador de células eliminadoras naturales, es una citocina heterodimérica (13) La expresión y aislamiento de la proteína IL-12 en las células hospederas recombinantes se describe en la solicitud de patente internacional publicada WO 90/05147 (14)

Otra citocina que mantiene una promesa potencial como un adyuvante es GM-CSF GM-CSF es un tipo particular de factor estimulador de colonias

43

46

(CSF, por sus siglas en inglés) Los CSFs son una familia de linfocinas que inducen las células progenitoras encontradas en la medula ósea para diferenciar en tipos específicos de células de sangre maduras Como se describiera en la patente norteamericana número 5,078,996 (15), la cual es incorporada a manera de referencia por este acto, GM-CSF activa los macrófagos o monocitos precursores para mediar la actividad tumoricida no específica La secuencia de nucleótidos que codifica el gen GM-CSF de humano ha sido descrita (15) Un plásmido que contiene el ADNc del GM-CSF ha sido transformado en *E coli* y ha sido depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, bajo el Número de Acceso 39900 Como se describiera en la patente norteamericana número 5,229,496 (16), la cual se incorpora a manera de referencia por este acto, el gen GM-CSF también ha sido insertado en el plásmido de expresión de levadura y depositado en la ATCC bajo el Número de Acceso No 53157 Además, como se describiera en la patente norteamericana número 5,073,627 (17), la cual se incorpora a manera de referencia por este acto, una secuencia de ADN que codifica los sitios de glicosilación que tienen GM-CSF removidos fue depositada en la ATCC bajo el Número de Acceso 67231

Se ha mostrado que GM-CSF sobre-regula las moléculas de proteína en células que presentan antígenos conocidas para aumentar las respuestas

44
41

inmunes (18) y para afectar la secreción de Ig en células B de murino purificadas por clasificación (19) El GM-CSF también ha sido descrito como un adyuvante para las composiciones inmunogénicas (20)

Se ha mostrado que otras citocinas o linfocinas tienen actividad moduladora de inmunidad que incluyen, pero no están limitadas a, las interleucinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los interferones-alfa, beta y gama, factor de estimulación de colonias de granulocitos y factores de necrosis tumorales alfa y beta

Las secuencias biológicas asociadas con la actividad de citocina o linfocina son de interés con relación a la administración sistémica de cualquier citocina o linfocina Adicionalmente, los efectos de citocina o linfocina relacionados con el desarrollo de las respuestas inmunes específicas para antígenos deben ser aumentados si se mantienen las concentraciones locales de citocinas o linfocinas

Las concentraciones del lípido A monofosforilo 3-O-desacilado o el lípido A monofosforilo con GM-CSF o IL-12 han sido evaluadas, se observó el aumento de diversos parámetros de respuesta inmune (21)

La invención descrita en este texto demuestra que, a través de la combinación de un antígeno, seleccionado de un adyuvante de citocina o linfocina, y el segundo adyuvante, un AGP (preferiblemente una emulsión metabolizable,

estable), las respuestas inmunes específicas para el antígeno son aumentadas

Los antígenos seleccionados para la inclusión en las composiciones antigénicas de esta invención comprenden péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, proteínas, así como también fragmentos de cualquiera de los siguientes sacáridos, proteínas, poli- u oligonucleótidos, u otros componentes macromoleculares Como se utiliza en este texto, un "péptido" comprende una serie de al menos tres aminoácidos y contiene al menos un determinante o epítopo antigénico, mientras que un "polipéptido" es una molécula más grande que un péptido, pero no constituye una proteína de longitud completa Estos péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser conjugados a una proteína no regulada, tal como toxoide de tétanos o toxoide de difteria Como se utiliza en este texto, un "fragmento" comprende una porción, pero menos de la totalidad de un sacárido, proteína, poli- u oligonucleótido, u otros componentes macromoleculares En el caso del HIV, las composiciones antigénicas de esta invención además comprenden proteínas de HIV de longitud completa

La invención es ejemplificada primero en un sistema de modelo que utiliza antígenos de péptidos derivados del HIV Estos péptidos son descritos o los derivados de las patentes norteamericanas números 5,013,548 (22) y 5,019,387 (23), las cuales son incorporadas por este acto a manera de referencia y ahora son resumidas Estos péptidos comprenden

secuencias de aminoácidos que corresponden a una región de la proteína de envoltura del HIV contra la cual se producen los anticuerpos neutralizantes y las respuestas de células T

El HIV es un retrovirus de humano el cual es el agente acusante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) El HIV infecta los linfocitos T del sistema inmune al atacar su glucoproteína de envoltura externa para la molécula CD4 (T4) en la superficie de los linfocitos T, utilizando de esta manera la molécula CD4 (T4) como un receptor para entrar e infectar las células T Los intentos para inducir una respuesta inmune protectora específica para la infección del HIV a través de la inmunización ha encontrado un éxito muy limitado En la actualidad, una variedad de planteamientos están siendo perseguidos en un intento para determinar una estrategia efectiva y protectora para el desarrollo de composiciones inmunogénicas Estas incluyen el uso de vectores bacterianos atenuados y recombinantes que expresan epítopos antigénicos del HIV (24), adenovirus recombinantes (25) o vectores de virus vacinia (26), inmunización de ADN (27) y péptidos sintéticos que contienen diversos epítopos de células T y B del HIV (28)

Se ha mostrado que la glicoproteína de envoltura externa del HIV gp120 es capaz de inducir la neutralización de anticuerpos en el hombre Se ha mostrado que la proteína recombinante PB1, la cual codifica aproximadamente una tercera parte de la

molécula completa gp120, incluye la parte de la proteína de envoltura que induce la formación de anticuerpos neutralizantes Sin embargo, los estudios en chimpancés demostraron que ni gp120 intacta ni PB1 son capaces de inducir la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes

Los péptidos cortos fueron sintetizados por métodos convencionales los cuales corresponden a los determinantes antigénicos de gp120 y generan una respuesta de anticuerpos contra gp120 que neutraliza el virus e induce la respuestas de auxiliares T y CTL contra el virus

Uno de tales péptidos es el péptido HIV-1_{MN} que contiene multiepítopos C4/V3 designado T1SP10MN(A)(+Cys), y una variante con la cisteina suprimida T1SP10MN(A)(-Cys) Estos péptidos incluyen los epítopos Th, T_{CTL} y B, los cuales no inducen los anticuerpos los cuales interfieren con la unión de CD4 Previamente, se ha demostrado que estos péptidos de HIV C4/V3 son candidatos prometedores para la inducción de respuestas inmunes cuando se administran con CF4 o adyuvantes similares a CFA (29-34) Se ha mostrado previamente que estos péptidos contienen epítopos que evocan las respuestas de células Th CD4+ Th tanto en ratones como humanos y que contienen tanto un determinante neutralizante principal como un sitio el cual es reconocido por CTL CD8+ tanto en los ratones Balb/c como en humanos que son HLA B7+ El péptido de 39 aminoácidos ha demostrado recientemente tanto inmunogenicidad como seguridad en pacientes

infectados con HIV (28)

El péptido T1SP10MN(A)(+Cys) tiene la siguiente secuencia de 40 aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (31) (SEC ID NO 1)

El péptido T1SP10MN(A)(-Cys) ha sido sintetizado sin la cisteina en la posición 17 y tiene la siguiente

secuencia de 39 aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2)

Este residuo de cisteina está localizado fuera de los epítopos funcionales reconocidos por las células Th, CTL o células B Otros péptidos de HIV de diversas regiones del genoma viral son descritos en la patente norteamericana número 5,861,243 (35), patente norteamericana número 5,932,218 (36), patente norteamericana número 5,939,074 (37), patente norteamericana número 5,993,819 (38), patente norteamericana número 6,037,135 (39), solicitud de patente Europea publicada Número 671,947 (40), y la patente norteamericana número 6,024,965 (41), las cuales también son incorporadas a manera de referencia

También se utiliza un conjugado de péptidos de 28 aminoácidos designado ST1/p11C El conjugado

consiste de un péptido auxiliar T derivado de SIV env de 16 aminoácidos designado ST-1, conjugado a un péptido de SIV mac 251 Gag de 12 aminoácidos (aminoácidos 179-190 de Gag) designado p11C (42) El péptido p11C en la forma terapéutica tiene la actividad de CTL demostrada en monos rhesus Mamu-A*01 infectados con SIV mac (43) El conjugado del péptido ST1-p11C tiene la siguiente secuencia de aminoácidos

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly
Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr
Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3)

También se utiliza un conjugado de péptidos de 39 aminoácidos designado C4-$V3_{89\ 6P}$ (44) La región C4 de este conjugado de péptidos (16 aminoácidos) es derivada de la cuarta región constante de la proteína de envoltura HIV-1 y representa un epítopo auxiliar T universal La porción V3 del péptido (23 aminoácidos) se deriva de la tercera región hipervariable de la proteína de envoltura de HIV-1 y representa un determinante neutralizador crítico El conjugado C4-$V3_{89\ 6P}$ tiene la siguiente secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn
Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg
Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4)

El antígeno del HIV puede ser una proteína, polipéptido, péptido o fragmento derivado de la proteína La proteína puede ser una glicoproteína tal como gp41, gp120 o gp160 Alternativamente, la proteína puede ser una proteína codificada por genes

tales como *gag, pol, vif, rev, vpr, tat, nef o env* Los péptidos derivados de tales proteínas contendrán al menos un determinante antigénico (epítopo) al menos seis aminoácidos de longitud

La respuesta inmune a un péptido de HIV puede ser aumentada al enlazar de manera covalente (conjugar) el péptido a una molécula portadora farmacéuticamente aceptable Ejemplos de tales moléculas portadoras adecuadas incluyen toxoides de tétanos, toxoides de difteria, hemocianina de lapa californiana y otros péptidos que corresponden a los epítopos de células T de la glicoproteína de HIV gp120

Actualmente se percibe que una estrategia exitosa para la inmunización contra el HIV necesitará producir una inmunidad de mucosas al HIV, así como también una buena respuesta de CTL En un estudio reciente en murinos utilizando el péptido multi-epítopos T1SP10MN(A) y un adyuvante de mucosas, toxina de cólera, se mostró que la inmunización intranasal indujo la neutralización de anticuerpos de IgG1 en el suero (45) Un estudio subsiguiente que también utiliza péptidos de asa HIV-V3 demostró la inducción del anticuerpo IgA sintetizado en mucosas y fuertes respuestas mediadas por células, que incluyen CTL específico para el péptido (46) El papel funcional de los altos títulos de anticuerpos sistémicos y neutralizantes en la prevención de, o estabilización de, individuos infectados con HIV es desconocido, aunque se cree que los altos títulos de

anticuerpos específicos para el virus son importantes en la prevención de la propagación del virus

En una modalidad preferida de la invención, se formula una emulsión estable de aceite en agua la cual contiene 529, el cual luego es mezclado con las citocinas IL-12 o GM-CSF Los datos presentados posteriormente demuestran que la combinación de 529 más GM-CSF da por resultado altos títulos de anticuerpos en el suero neutralizantes de HIV La combinación de 529-SE y GM-CSF induce altos títulos de anticuerpos de IgG específicos para el antígeno, que incluyen las subclases tanto IgG1 e IgG2a, en la bóveda vaginal de ratones hembras inmunizados La inmunización de ratones con el péptido T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con 529-SE y GM-CSF indujo una fuerte respuesta inmune celular determinada por la proliferación y secreción celular específica para el antígeno aumentada en el cultivo de citocinas, así como también la inducción de respuestas de CTL específicas para el péptido Se observaron resultados similares cuando los ratones fueron inmunizados con el péptido Aβ1-42 de APP con un 529-SE y GM-CSF

Generalmente, la formulación de antígeno/adyuvante de 529 o 529-SE combinado con GM-CSF o IL-12 y un péptido o proteína de la selección induce altos títulos del anticuerpo neutralizante del virus y específico para el antígeno, un cambio significante en la relación de subclases de IgG a una proporción más grande de anticuerpos de IgG fijadores de complemento (a favor de IgG2a en ratones), la

52
49

producción elevada de citocinas y la proliferación celular de células mononucleares en respuesta a la estimulación de antígenos *in vitro* Esas propiedades no se observaron con las formulaciones del antígeno y SE en ausencia de 529, ya sea con o sin GM-CSF o IL-12 Las formulaciones de esta invención también inducen buenas respuestas celulares determinadas a través de la inducción de CTL

Un beneficio de la 529-SE es que la formulación no induce la acumulación de granulomatosa e inflamación en el sitio de la inyección, estas reacciones en el sitio de inyección son inducidas típicamente por las formulaciones adyuvantes de agua en aceite o aceite en agua

Se condujo un experimento para comparar la administración del péptido del HIV T1SP10MN(A)(-Cys) con 529-SE sola, o con 529-SE más IL-12, o 529-SE más GM-CSF

En este experimento (tabla 1 posteriormente), los ratones Balb/c inmunizados por la ruta subcutánea con el péptido del HIV T1SP10MN(A)(-Cys), formulado con 529-SE, produjeron títulos de IgG en el suero específicos para el péptido después de únicamente dos inyecciones Los títulos de las subclases IgG1 e IgG2a también se produjeron La inclusión de un segundo adyuvante, ya sea GM-CSF o IL-12, incrementó los títulos totales de IgG, así como también los títulos de la subclase IgG1 La adición de IL-12 incrementó el título de la subclase IgG2a, la adición de GM-CSF no incrementó el

título de la subclase IgG2a

En otro experimento, como una medida de la inmunidad mediada por células funcionales, se valoró la capacidad de las células del bazo de ratones inmunizados con 529-SE o 529-SE más IL-12, o 529-SE más GM-CSF, formulado junto con el péptido de múltiples epítopos T1SP10MN(A)(-Cys) para generar respuestas de CTL específicas para HIV_{MN}

Como se muestra en la tabla 2, las células del bazo de ratones inmunizados con cualquiera de los adyuvantes demostraron baja actividad hacia las células objetivo que fueron ya sea no etiquetadas o etiquetadas por impulsos con el epítopo irrelevante de CTL IIIB La lisis de células objetivo mediada por CTL específica para HIV_{MN} se aumentó marcadamente cuando se administró 529-SE más IL-12 comparado con 529-SE sola y aumento aun adicionalmente cuando se administró 529-SE más GM-CSF (tabla 2)

En aun otro experimento, los monos rhesus fueron inmunizados con los péptidos ST1-p11C o C4-$V3_{89\ 62}$ e IFA o 529-SE más GM-CSF (grupos mostrados en la tabla 15) Los resultados de los análisis se muestran en la tabla 16-22 y ahora son resumidos

La formulación del péptido ST-p11C misma pareció ser bien tolerada en todos los animales sometidos a prueba Sin embargo, se observaron reactividades significantes en el sitio de inyección con el adyuvante IFA Además, se observaron efectos adversos menores, posibles de la formulación de adyuvantes 529-SE/GM-CSF inmediatamente después de la

inmunización final La formulación del péptido ST1-p11C que contenía IFA fue capaz de inducir una potente respuesta inmune celular específica para p11C en uno de dos monos rhesus positivos de Mamu-A*01 sometidos a prueba La formulación del péptido ST1-p11C que contenía 529-SE/GM-CSF también fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica para p11C en uno de dos monos rhesus positivos de Mamu-A*01 sometidos a prueba

La formulación del péptido C4-$V3_{89\ 6P}$ que contenía IFA fue capaz de generar títulos de anticuerpos ELISA en el plasma máximos en el rango de 1 25,600 - 1 102,400 y títulos de anticuerpos neutralizadores en el suero contra $SHIV_{89\ 6}$ y $SHIV_{89\ 6P}$ La formulación del péptido C4-$V3_{89\ 6P}$ que contenía 529-SE/GM-CSF fue capaz de generar títulos de anticuerpos ELISA en el plasma máximos en el rango de 1 6,400 - 1 12,800 y bajos niveles de respuesta de anticuerpos neutralizadores para $SHIV_{89\ 6}$, pero no para $SHIV_{89\ 6P}$

Dado el pequeño número de animales por grupo (dos), es difícil sacar conclusiones concretas Sin embargo, el nivel de respuesta inmune, tanto humoral como celular, generada tanto por formulaciones de péptido que contenían 529-SE/GM-CSF fue cuantitativamente inferior que la respuesta inmune observada en animales auxiliados con IFA Siempre se debe observar que IFA no es un componente aprobado en las composiciones para el uso comercial en humanos Además, existe alguna evidencia limitada que las propiedades funcionales y el fenotipo (es decir

perfiles de citocinas) de las células sensibles podría ser diferente dependiendo de la formulación adyuvante utilizada

En aun otro experimento, los animales de una segunda especie de primates, macacos cynomologous, fueron inmunizados con el péptido C4-$V3_{89\ 6P}$ que había sido modificado al cambiar el ácido glutámico en el residuo de aminoácido 9 a valina El conjugado de péptidos resultante designado C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ tiene la siguiente secuencia

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

Los animales fueron inmunizados con el péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$, ya sea sin adyuvante o con la combinación de 529-SE más GM-CSF

Los resultados indican que el péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ cuando se administró mediante inyección intramuscular en combinación con 529-SE/GM-CSF produce títulos de IgG específicos para el péptido significantemente superiores en el suero que la misma cantidad del péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ administrado por la ruta intranasal sin adyuvantes (Figuras 7-9) Los resultados de este experimento demuestran claramente que un inmunógeno de péptido de HIV, cuando se administra en combinación con la combinación apropiada de adyuvantes, es capaz de producir inmunidad humoral, sistémica

Las composiciones inmunogénicas deseables

para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por la deposición amiloidea (una molécula misma) en un hospedero vertebrado, el cual contiene las combinaciones adyuvantes de esta invención, incluyen aquellas que contienen porciones de la proteína precursora amiloidea beta (APP, por sus siglas en inglés) Esta enfermedad es referida variadamente como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de amiloidosis o amiloidogénica El péptido β-amiloideo (también referido como péptido Aβ) es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de APP, el cual es generado mediante el procesamiento de APP por las enzimas secretaza β y γ El péptido Aβ1-42 tiene la siguiente secuencia

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID NO 6)

En algunos pacientes, el depósito amiloideo toma la forma de un péptido Aβ agregado Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la administración del péptido Aβ aislado induce una respuesta inmune contra el componente de péptido Aβ de un depósito amiloideo en un hospedero vertebrado (47) De esta manera, Las composiciones inmunogénicas de esta invención incluyen las combinaciones adyuvantes de esta invención más el péptido Aβ, así como también fragmentos, derivados o modificaciones del péptido Aβ y anticuerpos para el péptido Aβ o fragmentos, derivados o modificaciones del mismo Un

fragmento de este tipo del péptido Aβ es el péptido de 28 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia (48) Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys (SEC ID NO 7)

Otros fragmentos del péptido Aβ que son de interés incluyen, pero no están limitados a, los aminoácidos 1-10, 1-7, 1-6, 1-5, 3-7, 1-3 y 1-4, los cuales pueden ser administrados en una forma no conjugada, o conjugados a una proteína no relacionada

Se condujeron una serie de estudios con el péptido Aβ1-42 y diversos adyuvantes Ahora se presentará un resumen de los resultados

En un primer experimento, los ratones Swiss-Webster inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con el péptido Aβ1-42 generaron títulos de anticuerpos de IgG, IgG1 e IgG2a específicos para el péptido generado Aβ1-42, demostrando que el péptido Aβ1-42 es un antígeno candidato, viable La adición de una emulsión estable de GM-CSF 529 y el péptido Aβ1-42 dio por resultado elevados títulos de anticuerpos de IgG, IgG1 e IgG2a en el suero elevados comparados con los receptores de 529-SE y el péptido Aβ1-42 (ver Tablas 3-8) Los anticuerpos en el suero de los ratones individuales que recibieron la combinación de 529-SE más GM-CSF se elevaron en la mayoría de los casos y se elevaron más rápidamente que los ratones individuales que recibieron 529-SE sola (datos no mostrados) Cuando este primer experimento se repitió

con ratones Swiss-Webster más viejos (6-8 meses en lugar de menos de 3 meses), se observaron resultados similares a aquellos en las Tablas 3-8 (datos no mostrados)

En un segundo experimento, los ratones Swiss-Webster fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con el péptido Aβ1-42 y 529-SE, con cantidades variantes de GM-CSF Los títulos a punto final de IgG incrementaron de una manera dependiente de la dosis cuando la cantidad de GM-CSF incrementó (de 0 1 a 1 a 10 µg) (tabla 9) Los títulos de IgG para todas las combinaciones de 529-SE más GM-CSF fueron más altos que para los grupos que recibieron otro adyuvante, QS-21, solo o con GM-CSF Los títulos de la subclase IgG1 también fueron incrementados por los diversos grupos de 529-SE más GM-CSF comparados con un grupo que recibió 529-SE más GM-CSF en una primera dosis y 529-SE sola en una segunda dosis (tabla 10) Los títulos de la subclase IgG2a también se incrementaron por diversos grupos de 529-SE más GM-CSF comparado con el grupo de 529-SE sola de una manera dependiente de la dosis (tabla 11)

En un tercer experimento, los ratones Swiss-Webster fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con el péptido Aβ1-42 y 529-SE, con o sin cantidades variantes de GM-CSF Los títulos a punto final de IgG se incrementaron para los diversos grupos de 529-SE más GM-CSF (0 5 a 2 a 5 a 10 µg), aunque no de una manera dependiente de la dosis

(tabla 12) Los títulos de las subclases tanto IgG1 e IgG2a también se incrementaron por los diversos grupos de 529-SE más GM-CSF comparado con el grupo de 529-SE sola, aunque no de una manera dependiente de la dosis (tablas 13 [IgG1] y 14 [IgG2a]

En un cuarto experimento, se utilizaron ratones transgénicos los cuales expresan una forma variante de la proteína precursora β-amiloidea (APP) que tiene una mutación en el residuo 717, con valina sustituida por fenilalanina (49) Esta mutación está asociada con la enfermedad de Alzheimer familiar en humanos Estos ratones transgénicos (designados ratones PDAPP) desarrollan progresivamente muchas de las marcas patológicas de la enfermedad de Alzheimer, inclusive depósitos de Aβ, placas neuríticas y astrocitosis, y de esta manera sirven como un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer en humanos

En este cuarto experimento, los ratones PDAPP fueron inmunizados por la ruta subcutánea con el péptido Aβ1-42 con o sin diversos adyuvantes y en las dosificaciones mostradas en la tabla A Específicamente, los ratones del grupo 1 recibieron el péptido Aβ1-42 con MPL^{MR} (Corixa, Hamilton, MT) en forma de emulsión estable (SE) como un control positivo, los ratones del grupo 2 recibieron el péptido Aβ1-42 con MPL^{MR}-SE más GM-CSF de murino, los ratones del grupo 3 recibieron el péptido Aβ1-42 con 529-SE más GM-CSF de murino, los ratones del grupo 4 recibieron PBS como un control negativo Los grupos 2 y 3 exhibieron un incremento más rápido en los

60
57

valores del título de anticuerpos anti-Aβ1-42 así como también un título máximo más alto que los grupo 1 o 4 Sin embargo, los títulos en los grupos 2 y 3 cayeron nuevamente al título equivalente de los controles positivos del grupo 1 dentro de 2-3 meses (figura A) Los grupos 1, 2 y 3 mostraron una disminución significante de los niveles de Aβ en el cerebro medidos por un ELISA (tablas B-C y figuras B-C), carga amiloidea inferior (tabla D y figura D), y menos distrofia neurítica (tabla E y figura E), comparado a los controles negativos del grupo 4 Los grupos 2 y 3 tuvieron una reducción significante en la astrocitosis comparado a los controles positivos del grupo 1 (figura 7)

De esta manera, las propiedades adyuvantes de 529-SE y GM-CSF o IL-12 parecen ser sinergistas cuando se formulan conjuntamente

Las composiciones antigénicas de la presente invención modulan la respuesta inmune al mejorar la respuesta de anticuerpos del hospedero vertebrado y la inmunidad mediada por células después de la administración de una composición antigénica que comprende un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, y una cantidad adyuvante efectiva de AGP tal como 529 (en una forma de emulsión acuosa o estable) combinado con una citocina o linfocina, en particular GM-CSF o IL-12 Se ha mostrado que otras citocinas o linfocinas tienen actividad modulatoria inmune, que incluyen, pero no están limitadas a, las interleucinas 1-alfa,

1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los interferones-alfa, beta y gama, factor de estimulación de colonias de granulocitos y los factores de necrosis tumoral alfa y beta

Los agonistas o antagonistas para ciertas citocinas o linfocinas también están dentro del alcance de esta invención Como se utiliza en este texto, el término "agonista" significa una molécula que aumenta la actividad de, o funciona de la misma manera como, las citocinas o linfocinas Un ejemplo de tal agonista es un imitador de las citocinas o linfocinas Como se utiliza en este texto, el término "antagonista" significa una molécula que exhibe o previene la actividad de las citocinas o linfocinas Ejemplos de tales antagonistas son el receptor de IL-4 soluble y el receptor de TNF soluble

Como se utiliza en este texto, el término "cantidad adyuvante efectiva" significa una dosis de la combinación de adyuvantes descrita en este texto, la cual es adecuada para producir una respuesta inmune incrementada a un antígeno seleccionado en un hospedero vertebrado, comparado con un hospedero que recibe ese antígeno seleccionado en la ausencia de la combinación adyuvante La dosificación particular dependerá en parte de la edad, peso y condición médica del hospedero, así como también del método de administración y el antígeno En una modalidad preferida, la combinación de adyuvantes utilizará 529 en el rango de 0 1-500 µg/dosis, en una modalidad preferida, el rango es 1-100 µg/dosis Las dosis

adecuadas son determinadas fácilmente por personas expertas en la técnica Las composiciones antigénicas de esta invención también pueden ser mezcladas con diluyentes o portadores inmunológicamente aceptables de una manera convencional para preparar soluciones o suspensiones líquidas, inyectables

Las composiciones antigénicas o inmunogénicas de esta invención se administran a un vertebrado humano o no humano mediante una variedad de rutas, que incluyen, pero no están limitadas a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica, (ver, por ejemplo, la solicitud internacional WO 98/20734 (50) la cual se incorpora por este acto a manera de referencia), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial La cantidad del componente o componentes de antígeno de la composición antigénica variará dependiendo en parte de la identidad del antígeno, así como también de la edad, peso y condición médica del hospedero, así como también del método de administración Nuevamente, las dosis adecuadas son determinadas fácilmente por las personas expertas en la técnica Es preferible, aunque no sea requerido, que el antígeno y la combinación de adyuvantes sean administrados al mismo tiempo El número de dosis y el régimen de dosificación para la composición antigénica también son determinados fácilmente por las personas expertas en la técnica En algunos casos, las propiedades adyuvantes de la combinación de adyuvantes puede

reducir el número de dosis necesarias o el curso de tiempo del régimen de dosificación

Las combinaciones de adyuvantes de esta invención son adecuadas para el uso en composiciones antigénicas o inmunogénicas que contienen una amplia variedad de antígenos de una amplia variedad de microorganismos patogénicos, que incluyen pero no están limitados a aquellos de virus, bacterias, hongos o microorganismos parasíticos los cuales infectan vertebrados humanos y no humanos, o de una célula de cáncer o célula de tumor El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como también fragmentos de cualquiera de los siguientes sacáridos, proteínas, poli- u oligonucleótidos, células de cáncer o tumor, alérgenos, moléculas mismas (tales como proteína precursora amiloidea), u otros componentes macromoleculares En algunos casos, más de un antígeno es incluido en la composición antigénica

Las composiciones inmunogénicas virales deseables que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la preservación y/o tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, virus de inmunodeficiencia humana, virus de inmunodeficiencia simia, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza tipos 1-3, virus de influenza, virus de herpes simple, citomegalovirus de humano, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de papiloma humano, virus de polio,

rotavirus, calicivirus, virus de sarampión, virus de parotiditis, virus de rubela, adenovirus, virus de rabias, virus de moquillo canino, virus rinderpest, virus metaneumónico de humano, neumovirus en aves (antiguamente virus de rinotraqueitis en pavos) virus Hendra, virus Nipah, coronavirus, parvovirus, virus de rinotraqueitis infecciosa, virus de leucemia felina, virus de peritonitis infecciosa en felinos, virus de enfermedad bursal infecciosa en aves, virus de enfermedad Newcastle, virus de enfermedad de Marek, virus de síndrome respiratorio y reproductivo en cerdos, virus de arteritis equina y diversos virus de encefalitis

Las composiciones inmunogénicas, bacterianas, deseables que contienen las combinaciones adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Alloiococcus otiditis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vidrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*,

Mycobacterium intracellulare complex, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Clostridium tetani, Leptospira interrogans, Borrelia burgdorferi, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae y Mycoplasma gallisepticum

Las composiciones inmunogénicas deseables contra los agentes patógenos fungales que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Aspergillis, Blastomyces, Candida, Coccidiodes, Cryptococcus e Histoplasma*

Las composiciones inmunogénicas deseables contra parásitos que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas hacia la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Leishmania major, Ascaris, Trichuris, Giardia, Schistosoma, Cryptosporidium, Trichomonas, Toxoplasma gondii y Pneumocystis carinii*

Las composiciones inmunogénicas deseables para producir un efecto anticancerígeno terapéutico o profiláctico en un hospedero vertebrado, las cuales contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención, incluyen aquellas que utilizan un antígeno de cáncer o un antígeno asociado con tumores que incluye, sin limitación, antígeno específico de próstata, antígeno carcino-embriónico, MUC-1, Her2,

CA-125 y MAGE-3

Las composiciones inmunogénicas deseables para moderar las respuestas a alérgenos en un hospedero vertebrado, que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención, incluyen aquellas que contienen un alérgeno o fragmento del mismo Ejemplos de tales alérgenos se describen en la patente norteamericana número 5,830,877 (51) y la solicitud de patente internacional publicada No WO 99/51259 (52), las cuales se incorporan por este acto a manera de referencia, incluyen polen, venenos de insectos, caspa de animales, esporas fungales y fármacos (tales como penicilina) Las composiciones inmunogénicas interfieren con la producción de anticuerpos de IgE, una causa conocida de reacciones alérgicas

Las composiciones inmunogénicas deseables para moderar las respuestas de las moléculas mismas en un hospedero vertebrado, las cuales contienen las combinaciones de adyuvantes de esta invención, incluyen aquellas que contienen una molécula misma o un fragmento de la misma Ejemplos de tales moléculas mismas, además del péptido Aβ1-24 descrito anteriormente, incluyen la insulina de cadena β involucrada en la diabetes, la molécula G17 involucrada en la enfermedad de reflujo gastroesofágico y antígenos los cuales contienen las respuestas autoinmunes en enfermedades tales como esclerosis múltiple, lupus y artritis reumatoide

En el caso del HIV y SIV, las composiciones

antigénicas comprenden al menos una proteína, polipéptido, péptido o un fragmento derivado de la proteína En algunos casos, las proteínas múltiples de HIV o SIV, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos son incluidos en la composición antigénica

Las formulaciones de combinación de adyuvantes de esta invención también son adecuadas para la inclusión como un adyuvante en composiciones inmunogénicas de polinucleótidos (también conocidas como composiciones inmunogénicas de ADN) Estas composiciones inmunogénicas pueden incluir además agentes facilitadotes tales como bupivicaina (ver la patente norteamericana número 5,593,972 (53), la cual se incorpora por este acto a manera de referencia)

A fin de que esta invención pueda ser mejor entendida, se exponen los siguientes ejemplos Los ejemplos son para el propósito de ilustración únicamente y no se deben interpretar como limítrofes del alcance de la invención

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en los experimentos reportados en los Ejemplos 2-7 a continuación

Animales

Los ratones hembra Balb/c, edad de 7-9

semanas, se adquirieron de Taconic Farms, Inc (Germantown, NY) Los ratones hembra Swiss-Webster, de 7-9 semanas de edad, también se adquirieron de Taconic Farms, Inc Todos los ratones fueron alojados en una instalación aprobada por la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care Los ratones se aclimataron a la instalación de alojamiento durante una semana antes del inicio de los estudios

Antígenos

En los experimentos con HIV de los Ejemplos 2-3 a continuación, se utilizaron dos diferentes péptidos sintéticos La secuencia del péptido multiepítopos HIV-1-$_{MN}$ T1SP10MN(A)(-Cys) (también referido aquí como MN-10) es como sigue

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2) Este péptido había sido descrito previamente (33,34), y contiene secuencias de HIV-1 gp120$_{MN}$ que evoca las respuestas de células Th CD4$^+$ en tanto ratones como humanos, un determinante de neutralización principal, y un sitio reconocido por CD8$^+$ CTL en ratones Balb/c El péptido fue proporcionado por el Dr R Scearce (Duke University, Dirham, NC) Para el análisis de CTL, se utilizó un péptido irrelevante designado IIIB para propósitos de comparación Este péptido correspondió al epítopo CTL dentro del asa V3 de

HIV-1-$_{IIIB}$ (Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile (SEC ID NO 8)), y se adquirió de Genosys Biotechnologies Inc (The Woodlands, TX) Los péptidos se solubilizaron en agua estéril y se diluyeron en amortiguadores apropiados, o medios de cultivos de células, antes del uso

En los experimentos amiloideos de los Ejemplos 4-6 y 8 posteriormente, se utilizó un péptido designado Aβ1-42 La secuencia de Aβ1-42 es como sigue

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID NO 6)

Este péptido ha sido descrito previamente (47) y corresponde a un fragmento interno de 42 aminoácidos de la proteína precursora amiloidea El péptido Aβ1-42 fue proporcionado por Elan Pharmaceuticals (South San Francisco, CA) El péptido se solubilizó en agua estéril y se diluyó en amortiguadores apropiados, o medios de cultivo de células, antes del uso

Adyuvantes

Todas las preparaciones de adyuvantes que contienen 529 se obtuvieron de Corixa (Hamilton, MT) La 529-SE se preparó como una emulsión de aceite en agua (0 8-2 5% de aceite) basada en escualeno preformulado, que tenía concentraciones de 529 que variaban (0-50μg/ml) El fosfato de

aluminio se preparó en casa El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto (IFA) se adquirieron de Difco Laboratories, Detroit, MI Los péptidos T1SP10MN(A) y los adyuvantes de Freund se emulsificaron en una relación 1 1 utilizando dos jeringas enlazadas La IL-12 de murino expresada de manera recombinante (fue proporcionada por Genetics Institute (Cambridge, MA) El GM-CSF de murino recombinante se adquirió de Biosource International (Camarillo, CA) como un polvo liofilizado libre de portadores El Stimulon^{MR} QS-21 se adquirió de Antigenics Inc (Framingham, MA)

Inmunizaciones

Los ratones fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea, en un volumen total de 0 2 ml dividido por igual en cada lado de los glúteos Las inmunizaciones se administraron en intervalos de tiempo variantes, como se indica a continuación Los antígenos y citocinas se diluyeron en solución salina amortiguada con fosfato a las concentraciones apropiadas y se formularon con adyuvantes menos de 16 horas antes de la inmunización, bajo condiciones estériles Las composiciones inmunogénicas se mezclaron mediante agitación suave y se almacenaron a 4°C Las formulaciones se mezclaron mediante un vórtice inmediatamente antes de la inmunización

Análisis de Suero Utilizando Ensayos de inmunoabsorbentes enlazados a enzimas

Los animales fueron sangrados antes de la inmunización inicial y en los puntos de tiempo indicados El análisis del suero fue como un promedio geométrico de los títulos individuales Para el análisis de la distribución de anticuerpos y subclases específicos del péptido de HIV, el péptido se suspendió en ya sea amortiguador de carbonato (Na_2CO_3 15mM, $NaHCO_3$ 35mM, pH 9 6) o PBS en una concentración de 1 µg/ml y se transfirieron a placas de microtítulo de 96 pocillos (Nunc) en un volumen de 100 1 Después de la incubación durante toda la noche a 37°C, las placas se lavaron y se bloquearon (gelatina 0 1%/PBS) a temperatura ambiente durante 2-4 horas Las placas de ELISA se lavaron con amortiguador de lavado (PBS, Tween[MR]20 0 1%) antes de la adición de suero diluido en serie (PBS, gelatina 0 1%, Tween[MR]20 0 05%, azida de sodio 0 02%) Después de una incubación de cuatro horas, los pocillos se lavaron y se adicionaron diluciones apropiadas de antiisotipos biotinilados/anticuerpos de subclases para la incubación durante toda la noche a 4°C Los pocillos se lavaron y se incubaron con peroxidasas de rábano picante conjugada con estreptavidina Después de la incubación, los pocillos se lavaron y se desarrollaron con ABTS Los pocillos se leyeron a 405 nm Los títulos se estandarizaron utilizando sueros de control

El mismo protocolo fue seguido para el análisis de la distribución de anticuerpos y subclases específicas para el péptido Aβ-42, excepto que se utilizó una concentración de 0 3 μg/ml por placa de microtítulo

Preparaciones de células

Para los ensayos de proliferación y análisis de citocina *in vitro*, se obtuvieron células de bazo de ratones en los puntos de tiempo indicados Las suspensiones de células individuales se prepararon de acumulaciones de 3-5 ratones Para la proliferación y análisis de citocinas, las células se suspendieron en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo previamente revestidas durante toda la noche con antígenos de péptidos de HIV, proteínas de control o RPMI-10 únicamente Las células de bazo se adicionaron a $5x10^5$ células/pocillo utilizando un medio de cultivo que tenía 2x complementos Los sobrenadantes del cultivo de células se recolectaron de los pocillos por triplicado para el análisis de citocinas tres o seis días después del inicio del cultivo Inmediatamente después de la recolección del sobrenadante, los cultivos se modularon por impulsos con ^{3}H-timidina durante 18-24 horas, y se colectaron para cuantificar la proliferación de células

Ejemplo 2

Títulos Totales y de Subclases a Punto Final de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys) Recíprocos

Se midieron los títulos de subclases de IgG a punto final recíprocos del suero acumulado (n=5 Babl/c) cinco semanas después de la inmunización inicial, dos semanas después de la inmunización secundaria Los ratones fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con 25 µg de T1SP10MN (A)(-Cys), con un total de 0 2 ml dividido por igual en dos inyecciones de 0 1 ml en cada lado, en la semana 0 y la semana 3 La 529-SE se diluyó para crear una emulsión que contenía aceite de escualeno 1 25% y 25 µg 529 por dosis La SE es un vehículo de emulsión de aceite en agua que consistía de escualeno, glicerol y un agente emulsionante La IL-12 de murino recombinante se suministró a 40 ng/ratón El GM-CSF de murino recombinante se suministró a 25 µg/ratón Los resultados se proporcionan en la tabla 1, con los títulos promedio geométricos más los errores estándar por cada grupo

Tabla 1

Títulos Totales y de Subclases a Punto Final de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys) Recíprocos

Adyuvantes	µg de péptido de HIV	Títulos a Punto final		
		IgG	IgG1	IgG2a
529-SE (25) (1 25% de aceite)	25	206,301 +/- 175,149	37,567 +/- 31,526	180,671 +/- 277,211

529-SE (25)	25	460,516	74,269	222,446
(1 25% de aceite) +		+/-	+/-	+/-
rIL-12 (04)		690,712	169,868	400,716
529-SE (25)	25	1,085,658	238,379	117,657
(1 25% de aceite) +		+/-	+/-	+/-
GM-CSF (25)		1,064 924	62,199	25,301

Ejemplo 3

Análisis de CTL en Ratones Balb/c

Los protocolos del Ejemplo 2 fueron seguidos con respecto a la inmunización de los ratones Se valoró la actividad de CTL de células de bazo aisladas de ratones 14 días después de la inmunización secundaria La 529-SE se formuló con 25 µg de 529-SE que contenía aceite 1 25%, con o sin 10 µg de GM-CSF o 40 ng de IL-12, más 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys)

Para el análisis de CTL, las células de bazo fueron removidas de ratones inmunizados 14 días después de la inmunización secundaria Un protocolo previamente descrito (39) fue seguido esencialmente En resumen, se acumularon las células del bazo con los eritrocitos agotados de tres ratones por grupo Las células efectoras del bazo ($4x10^6$/ml) se estimularon nuevamente en placas de cultivo a 24 pocillos en un volumen de 1 5-2 ml durante siete días con 1 µg/ml de ya sea el péptido "MN-10", el péptido de epítopo de CTL 10mer CTL "IIIB", o sin péptido de HIV Los epítopos de CTL se restringieron a $H\text{-}2D^d$ Los cultivos se complementaron con 100 U/ml de IL-2 de

murino recombinante (Biosource) durante los últimos cinco días de cultivo Para el análisis de la actividad citotóxica, las células P815 se etiquetaron con Cr^{51} y se modularon con impulsos con 5 μg/ml de péptido (IIIB o MN-10) durante cuatro horas, y se adicionaron a las células efectoras, esplénicas, cultivadas Cuando no se utilizó péptido de HIV, ese conjunto de células objetivo no fue modulado por impulsos Se utilizaron diluciones por triplicado de las relaciones de células efectoras a objetivo ("E O") de 30 1 hasta 1 1 1 El porcentaje de actividad de CTL se calculó como el porcentaje de liberación de cromo utilizando (liberación de cromo específica - liberación de cromo espontánea) / (liberación de cromo máxima - liberación de cromo espontánea)) x 100 La liberación de cromo se valoró después de un periodo de incubación de seis horas La liberación espontánea promedio del cromo fue siempre menor que 15% de la liberación máxima Los resultados de los datos del día 28 se muestran en la tabla 2

Tabla 2

Relaciones de células Efectoras a Objetivo

	Péptido MN-10		Péptido IIIB		Sin Péptido	
529-SE +						
% de liberación específ-	* IL-12	GM-CSF	* IL-12	GM-CSF	* IL-12	GM-CSF

fica E O									
30 1	31	53	71	8	11	19	4	8	8
10 1	19	41	70	5	8	21	2	5	9
3 3 1	5	11	35	2	1	5	-2	-2	-1
1 1 1	2	4	14	1	0	2	-3	-2	-3

* Sin adyuvante adicional

Ejemplo 4

Títulos Totales y de Subclases a Punto Final de IgG anti-Aβ1-42 Recíprocos

Los ratones exogámicos Swiss-Webster se dividieron en grupos de diez ratones cada uno Cada grupo recibió 30 µg del péptido Aβ1-42, lo cual corresponde a una región interna de 42 aminoácidos de largo de APP El primer grupo no recibió un adyuvante, el segundo grupo recibió 50 µg de la 529-SE que contenía 2 5% de aceite, el tercer grupo recibió 50 µg de la 529-SE que contenía 2 5% de aceite más 10 µg de GM-CSF, el cuarto grupo recibió 10 µg de GM-CSF, el quinto grupo recibió la emulsión estable que contenía 1 25% de aceite, el sexto grupo recibió la emulsión estable que contenía 1 25% de aceite más 10 µg de GM-CSF, el séptimo grupo recibió 50 µg de QS-21 Los ratones fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con un volumen total de 0 2 ml, dividido por igual en cada uno de los dos sitios en la base de la cola/región glútea

77
74

Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 3

Los ratones fueron sangrados en los días 0, 20, 35 y 70 Se analizó el suero de los ratones individuales Los títulos de las clases y subclases totales a punto final de IgG del péptido anti-Aβ1-42 a punto final recíprocos se midieron de los sueros individuales (n=10 Swiss-Webster) en la semana 5 y en la semana 10 Los resultados a punto final de IgG se proporcionan en la tabla 3 (semana 5) y 4 (semana 10) Los resultados de la subclase IgG1 se proporcionan en la tabla 5 (semana 5, los grupos que no recibieron adyuvante o QS-21 no se midieron) y 6 (semana 10) Los resultados de la subclase IgG2a se proporcionan en la tabla 7 (semana 5, los grupos que no recibieron adyuvante o QS-21 no se midieron) y 8 (semana 10)

Tabla 3

Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
Ninguno	12,976	+/- 14,386
529-SE (50)	16,204	+/- 225,221
529-SE (50) + GM-CSF (10)	608,474	+/- 623,575

GM-CSF (10)	214,497	+/- 609,067
SE (1%)	33,342	+/- 15,493
SE (1%) + GM-CSF (10)	453,367	+/- 162,750
QS-21 (50)	4,076	+/- 9,036

Tabla 4

Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 10 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
Ninguno	21,426	+/- 24,959
529-SE (50)	86,847	+/- 187,792
529-SE (50) + GM-CSF (10)	943,075	+/- 989,177
GM-CSF (10)	1,049,414	+/- 390,525
SE (1%)	255,631	+/- 114,025
SE (1%) + GM-CSF (10)	1,005,899	+/- 407,108

QS-21 (50)	47,222	+/- 159,775

Tabla 5

Títulos a Punto Final de IgG1 en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (50)	461	+/- 627
529-SE (50) + GM-CSF (10)	1,936	+/- 12,680
GM-CSF (10)	8,654	+/- 10,100
SE (1%)	4,515	+/- 6,273
SE (1%) + GM-CSF (10)	24,422	+/- 19,764

Tabla 6

Títulos a Punto Final de IgG1 en la Semana 10 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
Ninguno	2,086	+/- 2,448

80
77

529-SE (50)	969	+/- 521
529-SE (50) + GM-CSF (10)	2,076	+/- 4,901
GM-CSF (10)	8,483	+/- 10,998
SE (1%)	3,623	+/- 3,456
SE (1%) + GM-CSF (10)	12,472	+/- 11,502
QS-21 (50)	988	+/- 895

Tabla 7

Títulos a Punto Final de IgG1 en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (50)	2,224	+/- 10,099
529-SE (50) + GM-CSF (10)	94,764	+/- 849,173
GM-CSF (10)	25,554	+/- 13,191
SE (1%)	1,484	+/- 2,271

81
78

SE (1%) + GM-CSF	8,405	+/-
31,303		
(10)		

Tabla 8

Títulos a Punto Final de IgG2a en la Semana 10 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
Ninguno	5,910	+/-
39,626		
529-SE (50)	5,969	+/-
9,100		
529-SE (50) + GM-	47,694	+/-
88,053		
CSF (10)		
GM-CSF (10)	64,910	+/-
54,824		
SE (1%)	2,350	+/-
2,326		
SE (1%) + GM-CSF	7,421	+/-
31,153		
(10)		
QS-21 (50)	3,544	+/-
26,332		

Ejemplo 5

Títulos Totales y de Subclases a Punto Final de anti-Aβ1-42 Recíprocos con Cantidades Variantes de GM-CSF

Los ratones exogámicos Swiss-Webster se dividieron en grupos de diez ratones cada uno Cada grupo recibió dos inmunizaciones de 30 µg del péptido Aβ1-42 en la semana 0 y 3 El primer grupo recibió 25 µg de 529-SE más 10 µg de GM-CSF, el segundo grupo recibió 25 µg de 529-SE más 1 µg de MG-CSF, el tercer grupo recibió 25 µg de 529-SE más 0 1 µg de GM-CSF, el cuarto grupo recibió 25 µg de 529-SE más 10 µg de GM-CSF en la primera dosis, seguido por 25 µg de 529-SE únicamente en la segunda dosis, el quinto grupo recibió 25 µg de QS-21, el sexto grupo recibió 25 µg de QS-21 más 10 µg de GM-CSF Los ratones fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con un volumen total de 0 2 ml, dividido por igual en cada uno de los dos sitios en la base de la cola/región glútea

Los ratones fueron sangrados en los días 0, 21 y 42 Los títulos de las subclases y clases IgG del péptido anti-Aβ1-42 al punto final recíprocos se midieron del suero individual (n=10) en la semana 6 Los resultados a punto final de IgG se proporcionan en la tabla 9 Los resultados de la subclase IgG1 se proporcionan en la tabla 10 Los resultados de la subclase IgG2a se proporcionan en la tabla 11

Tabla 9

Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 10 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error

Estándar			
529-SE (25) + GM-CSF (10)	353,660	+/-	148,940
529-SE (25) + GM-CSF (1)	150,935	+/-	218,332
529-SE (25) + GM-CSF (0 1)	86,145	+/-	91,724
529-SE (25)*	25,365	+/-	54,083
QS-21 (25)	1,866	+/-	18,430
QS-21 (25) + GM-CSF (10)	48,970	+/-	116,106

* Primera dosis 529-SE (25) + GM-CSF (10), segunda dosis 529-SE (25) sola

Tabla 10

Títulos a Punto Final de IgG1 en la Semana 6 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar	
529-SE (25) + GM-CSF (10)	10,867	+/-	18,333
529-SE (25) + GM-CSF	24,909	+/-	18,625

CSF (1)		
529-SE (25) + GM-	6,608	+/-
17,736		
CSF (0 1)		
529-SE (25)*	4,511	+/-
8,154		
QS-21 (25)	581	+/-
126		
QS-21 (25) +	7,618	+/-
29,145		
GM-CSF (10)		

* Primera dosis 529-SE (25) + GM-CSF (10), segunda dosis 529-SE (25) sola

Tabla 11

Títulos a Punto Final de IgG2a en la Semana 6 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (25) + GM-	243,758	+/-
354,383		
CSF (10)		
529-SE (25) + GM-	116,222	+/-
143,140		
CSF (1)		
529-SE (25) + GM-	98,018	+/-
391,797		
CSF (0 1)		
529-SE (25)*	16,018	+/-

165,298

QS-21 (25) no hecho +/- no hecho

QS-21 (25) + 30,133 +/- 134,774 GM-CSF (10)

* Primera dosis 529-SE (25) + GM-CSF (10), segunda dosis 529-SE (25) sola

Ejemplo 6

Títulos Totales y de Subclases a Punto Final de anti-Aβ1-42

Recíprocos con Cantidades Variantes de GM-CSF

Los ratones exogámicos Swiss-Webster se dividieron en grupos de diez ratones cada uno Cada ratón recibió inmunizaciones en la semana 0 y en la semana 3, con 30 µg del péptido Aβ1-42 cada vez En la inmunización de la semana 0, el primer grupo recibió 50 µg de 529-SE, el segundo grupo recibió 50 µg de 529-SE más 10 µg de MG-CSF, el tercer grupo recibió 50 µg de 529-SE más 5 µg de GM-CSF, el cuarto grupo recibió 50 µg de 529-SE más 2 µg de GM-CSF, el quinto grupo recibió 50 µg de 529-SE más 2 µg de GM-CSF, el sexto grupo recibió 1% de SE En la inmunización de la semana 3, los grupos primero hasta quinto recibieron la misma dosis como la inmunización de la semana 0, excepto que la 529-SE se redujo de 50 a 25 µg La cantidad de SE recibida por el sexto grupo se incrementó de 1% en la inmunización de la semana 0 a

1 2% en la inmunización de la semana 3 Los ratones fueron inmunizados por la ruta subcutánea en la región glútea con un volumen total de 0 2 ml, dividido por igual en cada de uno de los dos sitios en la base de la cola/región glútea

Los ratones fueron sangrados en los días 2, 20 y 35 Los títulos de las clases y subclases de IgG del péptido anti-Aβ1-42 a punto final recíprocos se midieron del suero individual (n=10) en la semana 5 Los resultados a punto final de IgG se proporcionan en la tabla 12 Los resultados de la subclase IgG1 se proporcionan en la tabla 13 Los resultados de la subclase IgG2a se proporcionan en la tabla 14

Tabla 12

Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (50)	6,119	+/- 3,103
529-SE (50) + GM-CSF (10)	52,312	+/- 78,421
529-SE (50) + GM-CSF (5)	16,392	+/- 17,706
529-SE (50) + GM-	321,524	+/- 224,875

CSF (2)		
529-SE (50) + GM-CSF (0 5)	36,934	+/- 29,449
SE (1%)	7,784	+/- 9,041

Tabla 13

Títulos a Punto Final de IgG1 en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (50)	499	+/- 676
529-SE (50) + GM-CSF (10)	1,424	+/- 2,468
529-SE (50) + GM-CSF (5)	3,407	+/- 5,653
529-SE (50) + GM-CSF (2)	18,328	+/- 8,067
529-SE (50) + GM-CSF (0 5)	3,526	+/- 17,606
SE (1%)	2,556	+/- 5,615

Tabla 14

Títulos a Punto Final de IgG2a en la Semana 5 anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Promedio Geométrico	Error Estándar
529-SE (50)	1,386	+/- 5,173
529-SE (50) + GM-CSF (10)	48,519	+/- 148,981
529-SE (50) + GM-CSF (5)	11,659	+/- 23,132
529-SE (50) + GM-CSF (2)	124,815	+/- 167,340
529-SE (50) + GM-CSF (0 5)	26,190	+/- 40,254
SE (1%)	694	+/- 1,325

Ejemplo 7

Inmunización con péptidos Th-CTL y C4-V3 de Mono Rhesus

El siguiente experimento se diseñó para comparar directamente una variedad de formulaciones de combinación de péptidos y adyuvantes en una especie de primate (monos rhesus) a fin de

identificar las combinaciones potenciales de péptidos/adyuvantes para avanzar hacia las pruebas clínicas en humanos Específicamente, la formulación adyuvante 529-SE con GM-CSF de humano se evaluó en comparación al adyuvante incompleto de Freund (IFA) en combinación con (1) un conjugado de péptidos de CTL auxiliares T derivados de env del SIV/gag del SIV (ST1-p11C) que tiene la siguiente secuencia

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly
Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr
Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3),

o (2) un conjugado de péptidos C4-V3 derivados de HIV-1 ($C4\text{-}V3_{89\ 6P}$) que tiene la siguiente secuencia

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn
Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg
Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4)

Diseño del Estudio Se utilizó un total de 8 animales para el estudio, 4 Mamu-A*01+ y 4 Mamu-A*01- descritos en la tabla 15

Tabla 15

529-SE & GM-CSF vs IFA

Grupo #	# de Animales	Animal #	Composición inmunogénica	Adyuvante
1	2 Mamu-A01+	95x009 93x021	ST1-p11C	IFA

2	2 Mamu-A01+	98N002	ST1-p11C	529-SE/GM-CSF
		98N008		
3	2 Mamu-A01-	98N007	C4-V3$_{89\ 6P}$	IFA
		98N013		
4	2 Mamu-A01-	95x011	C4-V3$_{89\ 6P}$	529-SE/GM-CSF
		96x004		

Los animales del grupo 1 recibieron 0 5 ml del péptido Th-CTL ST1-p11C (1 0 mg/ml) en una emulsión de agua en aceite con 0 5 ml de IFA en un volumen total de 1 0 ml Los animales del grupo 2 recibieron 0 5 ml de ST1-p11C (1 0 mg/ml) combinado con 250 µg de GM-CSF de humano, 50 µg de 529-SE con una concentración de aceite final de 1% en un volumen total de 1 0 ml Los animales del grupo 3 recibieron 0 5 ml del péptido C4-V3$_{89\ 6P}$ (2 0 mg/ml) en una emulsión de agua en aceite con 0 5 de IFA, volumen final de 1 0 ml Finalmente, los animales del grupo 4 recibieron 0 5 ml del péptido C4-V3$_{89\ 6P}$ (2 0 mg/ml) combinado con 250 µg de GM-CSF de humano, 50 µg de 529-SE con una concentración de aceite final de 1% en un volumen total de 1 0 ml

Todos los animales fueron inmunizados mediante la inyección intramuscular en un programa de 0, 4 y 8 semanas Las muestras de sangre periférica se extrajeron inmediatamente antes y 1 o 2 semanas después de cada inmunización para verificar la inducción de CTL por la tinción de tetrámero, p11C (Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met, SEC ID NO 3,

aminoácidos 19-27)- respuestas específicas ELISPOT y respuestas de CTL en cultivo en gran cantidad (grupos 1 y 2) así como también para las respuestas de anticuerpos específicos para el péptido (grupos 1-4)

Seguridad y Tolerabilidad

ST1-p11C + IFA La formulación de ST1-p11C + IFA, la cual se administró mediante la inyección intramuscular en un sitio individual tres veces en los animales del grupo 1, estuvo asociada con una reactividad significante en el sitio de inyección Un animal (93x021) desarrolló un absceso con una dimensión de 1 5 centímetros en el sitio de la inyección dos semanas después de la segunda inmunización El otro animal (95x009) también desarrolló un absceso con una dimensión de 2 0 centímetros en el sitio de la inyección dos semanas después de la tercera inmunización, el cual se reventó a través de la piel y requirió material de curación

ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF La formulación de ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF, la cual se administró mediante una inyección intramuscular en un sitio individual tres veces en los animales del grupo 2, estuvo asociada con efectos adversos menores Ambos animales del grupo 2 vomitaron brevemente después de recibir la tercera inmunización en la semana 8 No se observaron otros efectos adversos

C4-$V3_{89\ 6p}$ + IFA La formulación de C4-$V3_{89\ 6p}$ + IFA, la cual se administró mediante inyección

intramuscular en un sitio individual tres veces en los animales del grupo 3, estuvo asociada con reactividad significante en el sitio de inyección Un animal (98n013) desarrolló un absceso con una dimensión de 1 0 centímetros en el sitio de la inyección una semana después de la segunda inmunización El otro animal (98n007) también desarrolló un absceso con una dimensión de 1 5 centímetros en el sitio de la inyección una semana después de la segunda inmunización Este absceso del animal requirió drenaje y material de curación cuatro semanas después

C4-V3$_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF La formulación de C4-V3$_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF, la cual se administró mediante inyección intramuscular en un sitio individual tres veces en los animales del grupo 4, estuvo asociada con un efecto adverso menor Uno de los animales del grupo 4 (95x011) vomitó brevemente después de recibir la tercera inmunización en la semana 8 No se observaron otros efectos adversos

En todos los animales del grupo 1 y el grupo 3, en los cuales los animales recibieron IFA como el adyuvante, se observaron reactividades significantes en el sitio de inyección Estos resultados indican que 0 5 mls de IFA es tolerado pobremente cuando se administran mediante la inyección intramuscular en un sitio de inyección individual También se observa que 3 de los 4 animales que recibieron 529-SE/GM-CSF como el adyuvante en la semana 8 vomitaron brevemente después de ser inmunizados Mientras se sabe que el

anestésico utilizado (quetamina) está asociado con el vómito, no se documentaron otros casos de vómito en los animales durante el curso del estudio En este tiempo, existe evidencia insuficiente para atribuir el vómito de los animales a cualquier efecto adverso asociado con 529-SE/GM-CSF

Resultados Inducción de Respuestas Inmunes, Celulares (Grupos 1 y 2)

Tinción de Sangre Reciente con p11C-tetrámero Antes de la inmunización, y una y dos semanas después de la inmunización, la sangre periférica recientemente aislada de todos los animales positivos Mamu-A*01 (grupos 1 y 2) se seleccionó por la presencia de linfocitos T $CD3^+CD8^+$ específicos para p11C mediante la tinción con tetrámero de clase I MHC soluble Como se muestra en la tabla 16, únicamente un animal (93x021), el cual recibió el péptido ST1-p11C en combinación con IFA, mostró evidencia de respuestas inmunes, celulares inducidas por la inmunización en la sangre periférica no estimulada

Tabla 16

Porcentaje de tinción con p11C-tetrámero y respuestas ELISPOT específicas para p11C en sangre periférica recientemente aislada

	Semana 0	Semana 5	Semana 6
	Previo a la	1 semana después	2 semanas después

			inmunización		de la 2ª inmunización		
de la 2ª inmunización							
Animal/ (Grupo)	Formulación	Tinción de sangre reciente con tetrámero[a]	# de SFC ELISPOT por 10^6 células	Tinción de sangre reciente con tetrámero[a]	# de SFC ELISPOT por 10^6 células	Tinción de sangre reciente con tetrámero[a]	# de SFC ELISPOT por 10^6 células
95x009(1) 0 00	ST1-p11C 3.8 + IFA	0 02		0 0	0 00	0 0	
93x021(1) 0 12	ST1-p11C 21 9 + IFA	0 02		Nd[b]	0 15	56 3	
98n002(2) 0 01	ST1-p11C 6.3 + 529-SE/ GM-CSF	0.00		0 6	0 05	0 0	
98n008(2) 0 01	ST1-p11C 9 4 + 529-SE/ GM-CSF	0 05		0 0	0 04	15 0	

		Semana 8			Semana 9		
Semana 10							
		4 semanas después		1 semana después		2 semanas después	
		de la 2ª Inmunización			de la 3ª inmunización		
de la 3ª Inmunización							
Animal	Formulación	Sangre reciente	ELISPOT	Sangre reciente	ELISPOT	Sangre reciente	ELISPOT

95
92

95x009(1)	ST1-p11C	0 00	Nd	0 01	2 5	
0 02	1 9					
	+ IFA					
93x021(1)	ST1-p11C	0.02	Nd	0 14	Nd	
0 02	Nd					
	+ IFA					
98n002(2)	ST1-p11C	0 06	Nd	0 00	Nd	
0 00	3 8					
	+ 529-SE/					
	GM-CSF					
98n008(2)	ST1-p11C	0 02	Nd	0 02	Nd	
0 00	0 0					
	+ 529-SE/					
	GM-CSF					

[a] Reportado como el porcentaje de linfocitos $CD3^+CD8^+$ en sangre reciente que se tiñen como positivos con el p11C-tetrámero, ND, no se hizo

[b] Nd = sin datos (en ésta y tablas subsecuentes)

Respuestas ELISPOT específicas para p11C

Para valuar adicionalmente la inducción de respuestas inmunes, celulares en los animales del grupo 1 y 2, los linfocitos de sangre periférica recientemente aislada se seleccionaron por la presencia de linfocitos T $CD3^+CD8^+$ específicos para p11C mediante el análisis ELISPOT Como se muestra en la tabla 16, únicamente el animal 93x021, el cual demostró niveles detectables de linfocitos $CD8^+$ específicos para p11C mediante el análisis con tetrámero en sangre reciente, tuvo linfocitos T $CD8^+$ detectables

específicos para p11C mediante el análisis ELISPOT En cada caso, una respuesta positiva mediante el análisis con p11C-tetrámero se corroboró mediante una respuesta ELISPOT positiva específica para p11C

Respuestas inmunes, celulares específicas para p11C después de la estimulación del péptido p11C *in vitro* En un esfuerzo para incrementar el número de células específicas para p11C antes del análisis, los linfocitos de sangre periférica recientemente aislada se estimularon *in vitro* con el péptido p11C y rhIL-2 Después de 14 días, las células efectoras resultantes se seleccionaron por la unión de p11C-tetrámero así como también por la actividad lítica específica para p11C funcional en un ensayo de CTL de liberación de cromo estándar Los resultados del análisis de p11C-tetrámero y los ensayos de CTL funcionales se muestran en la tabla 17 El animal 93x021, el cual mostró consistentemente respuestas inmunes específicas para p11C en linfocitos aislados recientemente, demostró un nivel muy alto de unión de tetrámero y actividad de CTL funcional una semana después de la segunda inmunización Esto indicó la inducción de una respuesta inmune celular específica para p11C muy potente En contraste a los resultados observados en los linfocitos aislados recientemente, un animal del grupo 2 (98n008, ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF) comenzó a mostrar evidencia de respuestas inmunes, celulares específicas para p11C dos semanas después de la segunda inmunización Sin embargo, la

97
94

respuesta inmune específica para p11C observada en el animal del grupo 2 fue de una magnitud significantemente menor que aquella observada en el animal respondedor del grupo 1

Tabla 17

Porcentaje de tinción con p11C-tetrámero y respuestas funcionales de CTL específicas para p11C después de la estimulación con el péptido p11C *in vitro*

		Semana 0		Semana 5		Semana 6	
		Previo a la inmunización		1 semana después de la 2ª inmunización		2 semanas después de la 2ª inmunización	
Animal/ (Grupo)	Formulación	Tinción con tetrámero[a]	CTL 20:1 E:O[b]	Tinción con tetrámero	CTL 20:1 E:O	Tinción con tetrámero	CTL 20:1 E:O
95x009(1) 0.27	ST1-p11C 0.0 + IFA	0.03	0.6	0.23	Nd		
93x021(1) 4.69	ST1-p11C + IFA	0.03	0.0	34.31	66.3	15.15	
98n002(2) 0.73	ST1-p11C + 529-SE/ Nd	0.21	0.0	Nd	Nd		

		GM-CSF					
	98n008(2)	ST1-p11C	0 16	0 0	Nd	Nd	
	5 84	Nd					
		+ 529-SE/					
5		GM-CSF					

		Semana 8		Semana 9		Semana 10	
		4 semanas después		1 semana después		2	
10	semanas después						
		de la 2ª inmunización		de la 3ª inmunización			
	de la 3ª inmunización						
	Animal/	Formula-	Tinción	CTL	Tinción	CTL	Tinción	CTL
	Grupo	ción	con	20 1 E O	con	20 1 E O	con	20 1 E O
			tetrámero		tetrámero		tetrámero	
	95x009(1)	ST1-p11C	Nd	Nd	0 76	3 0		
	0 72	0 0						
15		+ IFA						
	93x021(1)	ST1-p11C	Nd	Nd	4 90	7 3		
	Nd	Nd						
		+ IFA						
	98n002(2)	ST1-p11C	Nd	Nd	0 07	5 7		
20	0.39	0 0						
		+ 529-SE/						
		GM-CSF						
	98n008(2)	ST1-p11C	Nd	Nd	2 24	11 4		
	5.00	0 0						
25		+ 529-SE/						
		GM-CSF						

[a] Reportado como el porcentaje de células cultivadas

99
96

$CD3^+CD8^+$ que se tiñeron como positivas con el p11C-tetrámero

[b] Reportado como el porcentaje de lisis específica para p11C (menos el fondo) en una relación de efector a objetivo (E O) de 20 1

Análisis de Citocina Intracelular Para caracterizar adicionalmente las propiedades funcionales y fenotípicas de los linfocitos específicos para el péptido p11C inducido por inmunógenos, se verificó la expresión intracelular de las citocinas tipo Th1 INF-γ, TNFα, IL-2 y la citocina tipo Th2 IL-4 La expresión intracelular de citocinas se verificó en linfocitos de sangre periférica después de una estimulación inicial *in vitro* en la presencia de 10 μM del péptido p11C y rhIL-2 Los cultivos luego se mantuvieron durante 14 días con 400 U/ml de IL-2 Después de dos semanas, las células cultivadas se estimularon con ya sea medios solos, o con 10 μM del péptido p11C + CD28 antihumano y CD49d antihumano durante una hora Después de una hora, las células se trataron con Brefeldin A durante cinco horas adicionales para permitir que las citocinas intracelulares se concentren en el retículo endoplásmico La expresión intracelular de citocinas luego se cuantificó mediante la citometría de flujo (tablas 18 y 19)

Como se muestra en la tabla 18, dos semanas después de la estimulación del péptido p11C *in vitro*, los linfocitos de sangre periférica $CD3^+$ del animal

AOO 97

93x021 del grupo 1 (ST1-p11C + IFA), mostraron un bajo nivel de expresión de citocinas tipo Th1, con menos de 1 5% de todas las células que secretan activamente INF-γ, TNFα, o IL-2 Aproximadamente 8% de todos los linfocitos $CD3^+$, después de la estimulación del péptido p11C *in vitro*, secretaron de manera activa la citocina tipo Th2 IL-4 y las células secretoras de IL-4 se encontraron limitadas al subconjunto de linfocitos $CD3^+CD4^+$ Después de una nueva exposición breve al péptido p11C, los subconjuntos de linfocitos p11C-tetrámero$^+$ y $CD3^+CD8^+$ secretaron de manera activa las citocinas tipos Th1 INF-γ y TNFα, pero no pudieron ser inducidas para secretar niveles significantemente incrementados de IL-2 Después de la nueva exposición al péptido p11C, la secreción de la citocina tipo Th2 IL-4 no fue afectada

Tabla 18

Análisis de citocinas intracelulares, animal 93x021 del grupo 1, dos semanas después de la segunda inmunización

Subconjunto de linfocitos	p11C Medios	p11C INF-γ	[a]S I	p11C Medios	p11C TNFα	S I
[b]P11C-tetrámero$^+$	977	27,612	28 3	90	20,342	226 0

101
98

[b]En gran cantidad $CD3^+$	7,628	65,567	8	6	12,256	51,361	4	2
[b]$CD3^+CD4^+$	2,488	5,545	2	2	6,252	2,827	0	4
[b]$CD3^+CD8^+$	5,273	60,573	11	5	6,865	48,439	7	1

	Medios	p11C IL-2	S I		Medios	p11C IL-4	S I	
[b]P11C-tetrámero$^+$	751	2,004	2	7	Nd	Nd	Nd	
[b]En gran cantidad $CD3^+$	2,879	6,463	2	2	78,069	90,563	1	2
[b]$CD3^+CD4^+$	1,377	1,683	1	2	71,275	81,437	1	1
[b]$CD3^+CD8^+$	1,502	4,783	3	2	6,794	9,126	1	3

Tabla 19

Análisis de citocinas intracelulares, animal 98n008 del grupo 2, una semana después de la tercera inmunización

Subconjunto de linfocitos	Medios	p11C INF-γ	[a]S I	Medios	p11C TNFα	S I
[b]P11C-tetrámero$^+$	545	560	1 0	748	454	

102
99

0 0					
[b]En gran cantidad CD3+	6,829	10,489	1 5	3,402	13,443
4 0					
[b]CD3+CD4+	3,310	3,789	1 1	1,428	2,567
1 8					
[b]CD3+CD8 +	3,189	6,825	2 1	2,587	11,324
4 4					

	Medios	p11C IL-2	S I	Medios	p11C IL-4	S I
[b]P11C-tetrámero+	77	456	5 9	Nd	Nd	Nd
[b]En gran cantidad CD3+	385	2,868	7 4	219,789	202,122	0 9
[b]CD3+CD4+	1,379	1,761	1 3	170,804	158,175	0 9
[b]CD3+CD8 +	36	2,095	58 2	49,053	44,083	0 9

[a] S I , índice de estimulación

[b] Reportado como el número de células indicadas que se tiñeron como positivo para la citocina indicada por 10^6 células CD3+, menos la tinción de fondo (control de isotipos)

Como se muestra en la tabla 19, dos semanas después de la estimulación del péptido p11C *in vitro*, los linfocitos de sangre periférica CD3+ del animal 98n008 del grupo 2 (ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF)

demostraron un bajo nivel de expresión de citocinas tipo Th1, con menos de 1 0% de todas las células que secretan de manera activa INF-γ, TNFα, o IL-2 De manera interesante, aproximadamente 20% de todos los linfocitos $CD3^+$ secretaron de manera activa la citocina tipo Th2 IL-4, un incremento de 2 5 veces en el número de células productoras de IL-4 comparado con el animal del grupo 1 Como fuera el caso con el animal del grupo 1, las células que secretaron IL-4 se encontraron limitadas al subconjunto de linfocitos $CD3^+CD4^+$ Después de una nueva exposición breve al péptido p11C, los subconjuntos de linfocitos p11C-tetrámero$^+$ y $CD3^+CD8^+$ del animal del grupo 2 pudieron ser estimulados para secretar TNFα, pero no INF-γ En contraste al animal del grupo 1, después de la nueva exposición al péptido, se pudo demostrar un incremento significante en la expresión de IL-2 por las células $CD3^+CD8^+$ Como fue el caso con el animal del grupo 1, después de la nueva exposición al péptido p11C, la secreción de la citocina de tipo Th2 IL-4 no fue cambiada

Resultados Respuestas Inmunes, Humorales Inducidas por Inmunógenos (grupos 1 y 2)

Para evaluar la inducción de las respuestas de anticuerpos humorales específicos para inmunógenos, los títulos de anticuerpos ELISA anti-ST1-p11C se midieron en el suero de los animales del grupo 1 y 2 inmediatamente antes de la inmunización 1 y 2 semanas después de la segunda y tercera

inmunizaciones Los resultados se resumen en la tabla 20

Tabla 20

Títulos a punto final de ELISA del suero de monos rhesus inmunizados con ST1-p11C (grupos 1 y 2)

Animal	Grupo	Formulación	Semana	Título de ST1-p11C Ab[a]
95x009	1	ST1-p11C + IFA	5	12,800
			6	12,800
			9	6,400
			10	12,800
93x021	1	ST1-p11C + IFA	5	51,200
			6	102,400
			9	51,200
			10	51,200
98x002	2	ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF	5	

<50

6

<50

9

1,600

10

<50

98n008 2 ST1-p11C + 529-SE/GM-CSF 5

200

6

200

9

12,800

10

6,400

[a] Los títulos de unión a punto final de anticuerpos se determinaron como el recíproco de la dilución más alta del plasma que da una lectura OD del experimento/control (E/C) de > 3 0

Respuestas Inmunes, Humorales Inducidas por Inmunógenos (grupos 3 y 4)

Para evaluar la inducción de respuestas de anticuerpos humorales específicos para inmunógenos y específicas para adyuvantes, los títulos de anticuerpos ELISA anti-C4-$V3_{89\ 6P}$ y anti-GM-CSF se midieron en el plasma de los animales de los grupos 3 y 4 inmediatamente antes de la inmunización y 1 y 2 semanas después de la segunda y tercera inmunización Los resultados se resumen en la tabla 21 Los

resultados indican que los títulos máximos de anticuerpos C4-$V3_{89\ 6P}$ en el plasma se generaron una semana después de la segunda inmunización en todos los animales sometidos a prueba Los títulos máximos de anticuerpos en el plasma en los animales del grupo 3 (C4-$V3_{89\ 6P}$ + IFA) fueron varias veces más altos que los títulos máximos de anticuerpos en el plasma observados en el grupo 4 (C4-$V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF) Los animales del grupo 4 demostraron niveles bajos pero detectables del título de anticuerpos anti-GM-CSF que alcanzaron el máximo una semana después de la tercera inmunización

Tabla 21

Títulos a punto final ELISA del plasma de monos rhesus inmunizados con C4-$V3_{89\ 6P}$ (grupos 3 y 4)

Animal/ Grupo	Formulación	Semana	Título de C4-V3 Ab[a]	Título de GM-CSF Ab Anti-humano
98n007(3)	C4-$V3_{89\ 6P}$ + IFA	5	102,400	<10
		6	25,600	<10
		9	25,600	<10
		10	25,600	<10
98n013(3)	C4-$V3_{89\ 6P}$ + IFA	5	12,800	<10
		6	6,400	<10
		9	12,800	10
		10	12,800	<10

96x004(4)	C4-$V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF	5	6,400	320
		6	1,600	160
		9	3,200	2,560
		10	1,600	1,280
95x011(4)	C4-$V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF	5	1,600	160
		6	800	80
		9	1,600	1,280
		10	1,600	1,280

[a] Los títulos de unión a punto final de anticuerpos se determinaron como el recíproco de la dilución más alta del plasma para dar una lectura OD del experimento/control (E/C) de > 3 0

La inducción de los anticuerpos neutralizantes en los animales de los grupos 3 y 4 también se verificó, los resultados se resumen en la tabla 22 Los resultados indican que tanto los animales del grupo 3 como los animales del grupo 4 habían desarrollado anticuerpos neutralizantes que fueron capaces de neutralizar el virus $SHIV_{89\ 6}$ *in vitro* Los títulos de anticuerpos neutralizantes para $SHIV_{89\ 6}$ observados en los animales del grupo 3 fueron generalmente más altos que aquellos observados en los animales del grupo 4 Además, después de la inmunización final, el suero de los animales del grupo tres demostró un bajo nivel de actividad neutralizante contra la cepa $SHIV_{89\ 6P}$ del virus, la cual es difícil de neutralizar

Tabla 22

Títulos de anticuerpos neutralizantes a punto final en el suero del monos rhesus inmunizados con $C4\text{-}V3_{89\ 6P}$ (grupos 3 y 4)

Animal/ Grupo	Formulación	Semana	Anticuerpo neutralizando para[a] $SHIV_{89\ 6}$	$SHIV_{89\ 6P}$
98n007(3)	$C4\text{-}V3_{89\ 6P}$ + IFA	0	<10	<10
		5	22	<10
		6	46	<10
		9	113	46
		10	74	71
98n013(3)	$C4\text{-}V3_{89\ 6P}$ + IFA	0	<10	<10
		5	12	<10
		6	19	<10
		9	36	18
		10	22	<10
96x004(4)	$C4\text{-}V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF	0	<10	<10
		5	<10	<10
		6	<10	<10
		9	26	<10
		10	<10	<10
95x011(4)	$C4\text{-}V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF	0	<10	<10

5	11	<10
6	<10	<10
9	19	<10
10	<10	<10

[a] Los títulos de anticuerpos neutralizantes son la dilución en el suero recíproca a la cual 50% de las células fueron protegidas de la eliminación inducida por el virus medida por la captación de rojo neutro

Ejemplo 8

Estudio de Eficacia Terapéutica de Ratones Transgénicos PDAPP Tratados con Aβ1-42 y Adyuvante(s)

El siguiente experimento se diseñó para comparar una variedad de formulaciones de combinación de adyuvantes en ratones Transgénicos PDAPP para someter a prueba la eficacia terapéutica del péptido Aβ1-42

Diseño del Estudio Los ratones transgénicos PDAPP de diez y medio a doce y medio meses de edad (machos y hembras) se dividieron en cuatro grupos de 40 ratones, clasificados de tal manera que cada grupo se unió entre sí tan estrechamente como fue posible por edad, sexo y origen transgénico Los grupos fueron como se describe en la tabla 23

Tabla 23

Grupos de Tratamiento de Ratones transgénicos

Grupo	Adyuvante	Dosis	Dosis de Aβ1-42	N al Inicio	N al Final

110
107

1	MPL-SE	25 μg	75/60 μg	40	35
2	MPL-SE+GM-CSF	25 μg/10μg	64/60 μg	41	34
3	529+GM-CSF	25 μg/10μg	64/60 μg	40	31
4	PBS	na	na	40	37

El péptido Aβ1-42 fue de Elan Pharmaceuticals, 529-SE y MPL^{MR}-SE fueron de Corixa, y el gen GM-CSF de murino fue de Biosource Todos los ratones recibieron inyecciones en las semanas 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 Los ratones fueron sangrados los días 5-7 después de la inyección, iniciando después de la segunda inyección Los grupos 1, 2 y 3 fueron inyectados por la ruta subcutánea con un volumen de 200 μl, mientras que el grupo 4 recibió 250 μl de dosificación subcutánea Los animales fueron sacrificados en la semana 25 del Estudio Los títulos se obtuvieron utilizando una dilución la cual da un valor de 50% de la lectura de densidad óptica máxima

Resultados

Respuesta de Anticuerpos e Inmunogenicidad

Todos los grupos alcanzaron su título promedio geométrico, máximo (GMT) de anticuerpos para el péptido Aβ1-42 en ya sea el segundo (RC529 + GM-CSF) o tercer sangrado (MPL^{MR}-SE, MPL^{MR}-SE + GM-CSF) (véase la figura 1) En el GMT máximo, MPL^{MR}-SE + GM-CSF fue 16,400, mientras que 529-SE + GM-CSF fue 13,400 o aproximadamente 1 5 veces del control de MPL^{MR}-SE de 9,700 Sin embargo, los títulos en las dos formulaciones que contenían GM-CSF (grupos 2 y 3)

AMT 108

cayeron nuevamente al nivel aproximado del control de MPL^{MR}-SE, con los GMTs finales de MPL^{MR}-SE = 4600, MPL^{MR} + GM-CSF = 5350, 529-SE + GM-CSF = 4650

Para determinar si la disminución eventual en el título de las dos formulaciones que contienen GM-CSF fue debido a una respuesta de anticuerpos anti-GM-CSF, se utilizó un ELISA para determinar si los anticuerpos anti-GM-CSF se habían formado durante el curso de la inmunización Los sueros de todos los animales que recibieron GM-CSF fueron titulados contra el GM-CSF de murino utilizado por todo este experimento No se encontró evidencia de anticuerpos anti-GM-CSF en ninguno de los animales tratados (datos no mostrados)

Niveles de Aβ en el Cerebro Todos los tres grupos de tratamiento redujeron significantemente la acumulación de tanto el péptido Aβ total (figura 3-resultados individuales, tabla 24-resultados acumulados) como Aβ-42 (figura 3-resultados individuales, tabla 25-resultados acumulados) en la región cortical del cerebro de ratones PDAPP Los ELISAs de Aβ (formas totales y 1-42) se realizaron como se describiera previamente (54) utilizando homogenados de cerebro solubilizados con guanidina Las comparaciones estadísticas utilizaron la prueba Mann-Whitney de significación

Tabla 24

Niveles Corticales de Aβ Total

	PBS	MPL-SE	MPL-SE +	529-SE +

			GM-CSF	GM-CSF
Promedio (ng/g)	6,478	1,707	925	1,313
Rango	64 - 17,208	33 - 8,501	67 - 5,293	79 - 5,271
% de Reducción	---	74	86	80
Valor P (M-W)	---	<0 0001	<0 0001	<0 0001
N	37	35	34	31

Tabla 25

Niveles Corticales de Aβ1-42 Total

	PBS	MPL-SE	MPL-SE + GM-CSF	529-SE + GM-CSF
Promedio (ng/g)	5,609	1,799	779	1,127
Rango	284 - 14,004	10 - 6,715	43 - 4,824	29 - 4,442
% de Reducción	---	68	86	80
Valor P (M-W)	---	<0 0001	<0 0001	<0 0001
N	36	35	34	31

Carga Amiloidea El grado de amiloidosis se cuantificó en la corteza frontal utilizando métodos inmunohistoquímicos como se describirá previamente (55) Todos los tres grupos de tratamiento mostraron una reducción significante en la carga amiloidea (figura 4-resultados individuales, tabla 26-resultados acumulados)

Tabla 26

Carga Amiloidea en la Corteza Frontal

	PBS	MPL-SE	MPL-SE + GM-CSF	529-SE + GM-CSF
Promedio (% de AB)	7 98	0 49	0 00	0 04
Rango	0 00 - 27 37	0 00 - 9 63	0 00 - 83	0 00 - 5 53
% de Reducción	------	94	100	99 5
Valor P (M-W)	------	<0 0001	<0 0001	<0 0001
N	29	33	29	30

Carga Neurítica El efecto del tratamiento sobre el desarrollo de la distrofia neurítica en la corteza frontal se valoró inmunohistoquímicamente como se describiera previamente (55) Todos los tres grupos de tratamiento redujeron significantemente el grado de carga neurítica con relación al control de PBS (figura 5-resultados individuales, tabla 27-resultados acumulados)

Tabla 27

Carga Neurítica en la Corteza Frontal

	PBS	MPL-SE	MPL-SE + GM-CSF	529-SE + GM-CSF
Promedio (% de AB)	0 35	0 14	0 04	0 02
Rango	0 00 -	0 00 -	0 00 - 0 60	0 00 - 0 91

	1 21	0 82		
% de Reducción	---	60	88	95
Valor P (M-W)	---	0 0153	< 0 0001	< 0 0001
N	29	33	29	30

Astrocitosis El grado de astricitosis en la corteza retroesplenial se cuantificó como se describiera previamente (55) Los grupos de tratamiento que contenían GM-CSF mostraron astrocitosis significantemente reducida (figura 6)

Ejemplo 9

Inmunización de Macacos Cynomologous con el péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$

El objetivo de este experimento fue evaluar la inmunogenicidad del conjugado de péptidos derivados de Env de HIV-1, C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$, administrado con o sin una combinación de adyuvantes de esta invención en otra especie de primates, monos cynomologous (*Macaca fascicularis*) El péptido C4-$V3_{89\ 6P}$ descrito en el Ejemplo 7 se modificó al cambiar el ácido glutámico en el residuo de aminoácido 9 a valina Se utilizó el conjugado de péptido resultante, designado C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$, y tiene la siguiente secuencia

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly
Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn
Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg
Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

La sustitución de ácido glutámico a valina (E9V) dentro de la región C4 del péptido incrementa la inmunogenicidad del péptido sobre aquella de la secuencia no modificada en el modelo de ratón

Este péptido derivado de Env de HIV-1 es capaz de producir respuestas inmunes, humorales en ratones Sin embargo, debido a la dificultad de extrapolar los resultados de ratones a humanos, es necesario someter a prueba las composiciones inmunogénicas, potenciales de HIV-1 en primates no humanos antes de proceder a las pruebas clínicas en humanos de fase I En este experimento, se evaluaron las rutas de administración tanto intramuscular (IM) como intranasal (IN) Los animales fueron inmunizados cinco veces en las semanas 0, 4, 8, 18 y 23 En una base semanal hasta la semana 25, las muestras de sangre y lavados cervicovaginales y de mucosas se colectaron y analizaron por la presencia de anticuerpos para la composición inmunogénica

Diseño Experimental Para el experimento se utilizó un total de ocho monos cynomologous, cuatro animales por grupo (tabla 28) El grupo 1 no recibió adyuvante, el grupo 2 recibió la formulación de adyuvante 529-SE más GM-CSF Los animales fueron alojados y evaluados en una instalación de cuidado animal

Tabla 28

529-SE + GM-CSF vs sin adyuvante

# de Grupo	Inmunógeno	Adyuvante	Ruta

1	Péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$	ninguno	IN
2	Péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$	529-SE/GM-CSF	IM

Inmunizaciones Todas las inmunizaciones intranasales fueron suministradas con un dispositivo de rocío nasal con dosis medidas de 100 µl Todas las inyecciones intranasales se administraron en el músculo cuadriceps con aguja y jeringa Todos los animales fueron inmunizados en un programa de 0, 4, 8, 18 y 23 semanas

Formulaciones

Grupo 1 1000 µg del péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en solución salina normal, estéril, volumen final de 200 µg (100 µg cada ventana de la nariz)

Grupo 2 1000 µg del péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$, 50 µg de 529-SE y 250 µg de GM-CSF de humano, concentración de aceite final 1%, volumen final 1 0 ml (500 µg cada cuadriceps mediante inyección IM)

Ensayos para verificar las respuestas inmunes inducidas por inmunógenos

Inmediatamente antes y después de la inmunización, todos los animales fueron observados estrechamente por las respuestas inmunes, humorales inducidas por inmunógenos mediante los siguientes ensayos

(1) Títulos de anticuerpos en el suero de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ del suero mediante un ELISA

(2) Títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en mucosas (cervicovaginal, nasal) mediante un ELISA

Resultados

Seguridad y Tolerabilidad de inmunógenos

El péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$, cuando se administró solo o en combinación con los adyuvantes 529-SE/GM-CSF, fue extremadamente bien tolerado Para los animales inmunizados por la ruta intramuscular utilizando aguja y jeringa, no se observaron reactividades adversas en el sitio de inyección Todos los animales fueron observados estrechamente por los cambios en la temperatura corporal durante 24 horas inmediatamente después de cada administración del inmunógeno En ningún momento durante el estudio, alguno de los animales demostró lecturas de temperatura corporal anormalmente elevada (datos no mostrados)

Respuestas de anticuerpos en el Suero específicos para el inmunógeno

Las muestras de suero de todos los animales se obtuvieron inmediatamente antes y una y dos semanas después de cada inmunización (hasta 25 semanas) Dos semanas después de la inmunización final, todas las muestras de suero se analizaron por la presencia de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-V3 Los animales del grupo 1 inmunizados por la ruta intranasal (péptido C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ solo)

fallaron al demostrar títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en el suero más altos que los niveles previos a la inmunización (figura 7) En contraste, los animales del grupo 2 (administración IM de C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ + 529-SE/GM-CSF) desarrollaron niveles significantes de anticuerpos de IgG específicos para C4(E9V)-V3 en el suero (figura 7) El título a punto final promedio geométrico, reportado se calcula utilizando el título inferior de cada animal individual que es tres veces superior a la lectura para el suero natural, acumulado en la misma dilución

Los animales del grupo 1 (sin adyuvante) tuvieron títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en las muestras de lavado cervicovaginal que fueron más altos que los niveles previos a la inmunización solo después de la cuarta inmunización, pero declinaron posteriormente (figura 8) En contraste, los animales del grupo 2 (con adyuvante) tuvieron títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en las muestras de lavado cervicovaginal que fueron más altos que los niveles previos a la inmunización después de la primera inmunización e incrementaron después de cada inmunización subsiguiente (aunque hubo algún descenso posterior en cada caso) (figura 8)

Los animales del grupo 1 (sin adyuvantes) fallaron al demostrar títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en los lavados nasales más altos que los niveles previos a la inmunización

(figura 9) En contraste, los animales del grupo 2 (con adyuvante) desarrollaron niveles significantes de títulos de anticuerpos de IgG del péptido anti-C4(E9V)-$V3_{89\ 6P}$ en las muestras de lavado nasal (figura 9)

120
119

Bibliografía

1 Mosmann, T R , y colaboradores, J Immunol, 136, 2348-2357 (1986)

2 Patente norteamericana número 5,057,540

3 Patente norteamericana número 6,113,918

4 Ahlers, J D , y colaboradores, J Immunol, 158, 3947-3958 (1997)

5 Scharton-Kersten, T , y colaborares, J Immunol, 154, 5320-5330 (1995)

6 Ghalib, H W , y colaboradores, J Immunol, 154, 4623-4629 (1995)

7 Murria, H W , y Hariprashad, J , J Exp Med , 181, 387-391 (1995)

8 Patente norteamericana número 5,571,515

9 Patente norteamericana número 5,723,127

10 Patente norteamericana número 5,976,539

11 Finkelman, F D , y Holmes, J , Ann Rev Immunol, 8, 303-333 (1990)

12 Snapper, C M , y colaboradores, J Exp Med , 175, 1367-1371 (1992)

13 Kobayashi, M , y colaboradores, J Exp Med , 175, 827-845 (1989)

14 Solicitud de patente internacional publicada número WO 90/05147

15 Patente norteamericana número 5,078,996

16 Patente norteamericana número 5,229,496

17 Patente norteamericana número 5,073,627

18 Alderson, M R , y colaboradores, J Exp Med , 178, 669-674 (1993)

19 Snapper, C M , y colaboradores, J

Immunol, 154, 5842-5850 (1995)

20 Patente norteamericana número 5,679,356

21 Solicitud de patente internacional publicada número WO 00/69456

22 Patente norteamericana número 5,013,548

23 Patente norteamericana número 5,019,387

24, Charbit, A , y colaboradores, Vaccine, 11, 1221-1228 (1993)

25 Natuk, R J , y colaboradores, AIDS Res Hum Retroviruses, 9, 395-404 (1993)

26 Johnson, R P , y colaboradores, J Virol , 68, 3145-3153 (1994)

27 Fuller, D H , y colaboradores, AIDS Res Hum Retroviruses, 10, 1433-1441 (1994)

28 Berzofsky, J A , y colaboradores, J Clin Invest , 88, 876-884 (1991)

29 Palker, T J , y colaboradores, J Immunol , 142, 3612-3619 (1989)

30 Hart, M K , y colaboradores, J Immunol , 145, 2677-2685 (1990)

31 Haynes, B F , y colaboradores, J Immunol , 151, 1646-1653 (1993)

32 Hart, M K , y colaboradores, Proc Natl Acad Sci , USA, 88, 9448-9452 (1991)

33 Bartlett, J A , y colaboradores, AIDS, 12, 1291-1300 (1998)

34 Haynes, B F , y colaboradores, AIDS Res Hum Retroviruses, 11, 211-221 (1998)

35 Patente norteamericana número 5,861,243

36 Patente norteamericana número 5,932,218

37 Patente norteamericana número 5,939,074

38 Patente norteamericana número 5,993,819

39 Patente norteamericana número 6,037,135

40 Solicitud de patente europea publicada número 671,947

41 Patente norteamericana número 6,024,965

42 Millar, M D , y colaboradores, J Immunol , 147, 320-329 (1991)

43 Kuroda, M J , y colaboradores, J Exp Med , 187, 1373-1381 (1998)

44 Liao, H-X y colaboradores, J Virol , 74, 254-263 (2000)

45 Staats, H F , y colaboradores, J Inmmunol , 157, 462-472 (1996)

46 Porgador, A , y colaboradores, J Inmmunol , 158, 834-841 (1997)

47 Solicitud de patente internacional publicada número WO 99/27944

48 Patente norteamericana número 4,666,829

49 Games, D , y colaboradores, Nature, 373, 523-527 (1995)

50 Solicitud de patente internacional publicada número WO 98/20734

51 Patente norteamericana número 5,830,877

52 Solicitud de patente internacional publicada número WO 99/51259

53 Patente norteamericana número 5,593,972

54 Johnson-Wood, D , y colaboradores, Proc Natl Acad Sci , USA, 94, 1550-1555 (1997)

55 Schenk, D , y colaboradores, Nature,

123
120

400, 173-177 (1999)

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención

AB4
121

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones

1 Una composición antigénica, caracterizada porque comprende un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, o de una célula de cáncer o célula de tumor, o de un alérgeno, o de una molécula misma, y una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (1) un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo y (2) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina, en donde la combinación de adyuvantes aumenta la respuesta inmune al antígeno en un hospedero vertebrado

2 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno seleccionado es un polipéptido, péptido o fragmento derivado de una proteína

3 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

4 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la citocina o linfocina se selecciona del grupo que consiste de un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos e interleucina-

12

5 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la citocina o linfocina es un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos

6 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

7 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la citocina o linfocina es interleucina-12

8 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma una emulsión estable de aceite en agua

9 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque además comprende un diluyente o portador

10 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma una emulsión estable de aceite en agua

11 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el AGP es
2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-β-D-

AB6
123

glucopiranosida) de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo (529)

12 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno seleccionado es del virus de inmunodeficiencia humana (HIV)

13 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el antígeno de HIV seleccionado es una proteína polipéptido, péptido o fragmento derivado de la proteína del HIV

14 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque los antígenos seleccionados son péptidos de HIV seleccionados del grupo que consiste de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2),

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg

(SEC ID NO 4), y

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

15 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1)

16 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2)

17 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3)

18 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada

A265
125

porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4)

19 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

20 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el AGP se utiliza en forma de una emulsión estable de aceite en agua

21 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque la citocina o linfocina se selecciona del grupo que consiste de un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos e interleucina 12

22 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque la citocina o linfocina es un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos

23 La composición antigénica de

AGT
125

conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

24 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque la citocina o linfocina es interleucina-12

25 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

26 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque además comprende un diluyente o portador

27 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

28 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el AGP es 529

29 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, para producir una respuesta inmune de un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1

30 Un método para incrementar la capacidad de la composición antigénica que contiene un antígeno

seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, para producir una respuesta inmune de un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 9

31 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno de HIV para producir una respuesta inmune en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12

32 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno de HIV para producir una respuesta inmune en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 26

33 El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque los antígenos seleccionados son péptidos de HIV seleccionados del grupo que consiste de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2),

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4), y

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

34 El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1)

35 El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2)

36 El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de

ABC
129

aminoácidos

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3)

37 El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4)

38 El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

39 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, para producir linfocitos T citotóxicos en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 1

40 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un

antígeno seleccionado de un virus patogénico, bacteria, hongo o parásito patogénico, para producir linfocitos T citotóxicos en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 9

41 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno de HIV para producir linfocitos T citotóxicos en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 12

42 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno de HIV para producir linfocitos T citotóxicos en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica de conformidad con la reivindicación 26

43 El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque los antígenos seleccionados son péptidos de HIV seleccionados del grupo que consiste de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala

Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2),

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3),

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4), y

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

44 El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 1)

45 El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID NO 2)

135
132

46 El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEC ID NO 3)

47 El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 4)

48 El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el péptido de HIV es el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEC ID NO 5)

49 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno de cáncer o un antígeno asociado con tumores seleccionado de una célula de cáncer o una célula de tumor para producir un efecto anticancerígeno, terapéutico o profiláctico en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende

administrar al hospedero una composición antigénica que comprende el antígeno de cáncer o un antígeno asociado con tumores seleccionado de una célula de cáncer o una célula de tumor, y una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (a) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (b) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

50 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un alérgeno seleccionado para moderar una respuesta alérgica en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero una composición antigénica que comprende el alérgeno, y una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (a) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (b) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

51 Una composición antigénica, caracterizada porque contiene un antígeno seleccionado de una molécula o porción de la misma, que representa aquellas producidas por un hospedero de una manera indeseada, una cantidad o ubicación para producir ese efecto indeseado, al incluir una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (a) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (b) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

52 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 51, caracterizada

porque el antígeno seleccionado es un polipéptido, péptido o fragmento derivado de la proteína precursora amiloidea, o un anticuerpo para el mismo

53 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 52, caracterizada porque el antígeno seleccionado es el péptido Aβ, el cual es un fragmento interno de 39-43 de aminoácidos de la proteína precursora, amiloidea o un fragmento del péptido Aβ

54 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque el antígeno seleccionado es el péptido Aβ que tiene la secuencia de aminoácidos

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID NO 6)

55 La composición antigénica de conformidad con la reivindicación 54, caracterizada porque el APG es 529

56 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado de una molécula o porción de la misma que representa aquellas producidas por un hospedero de una manera indeseada, una cantidad o ubicación para reducir ese efecto indeseado, al incluir una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (a) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (b) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

57 Un método para incrementar la capacidad de una composición antigénica para prevenir o tratar una enfermedad distinguida por la deposición amiloidea en un hospedero vertebrado, caracterizado porque comprende administrar al hospedero un polipéptido, péptido o fragmento derivado de una proteína precursora amiloidea, o un anticuerpo para el mismo, y una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de (a) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (b) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

58 El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el antígeno seleccionado es el péptido Aβ, el cual es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de la proteína precursora, amiloidea o un fragmento del péptido Aβ

59 El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque el antígeno seleccionado es el péptido Aβ que tiene la secuencia de aminoácidos

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID NO 6)

60 El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado por AGP es 529

61 Una formulación adyuvante, caracterizada porque comprende la combinación de (a) un compuesto de fosfato de aminoalquil-glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo, y (b) una

citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina

62 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque el AGP se utiliza en la forma de una emulsión estable de aceite en agua

63 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque la citocina o linfocina se selecciona del grupo que consiste de un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos e interleucina 12

64 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque además comprende un diluyente o portador

65 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque la citocina o linfocina es un factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos

66 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque la citocina o linfocina es interleucina 12

67 La formulación adyuvante de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque el AGP es 529

Figura 1

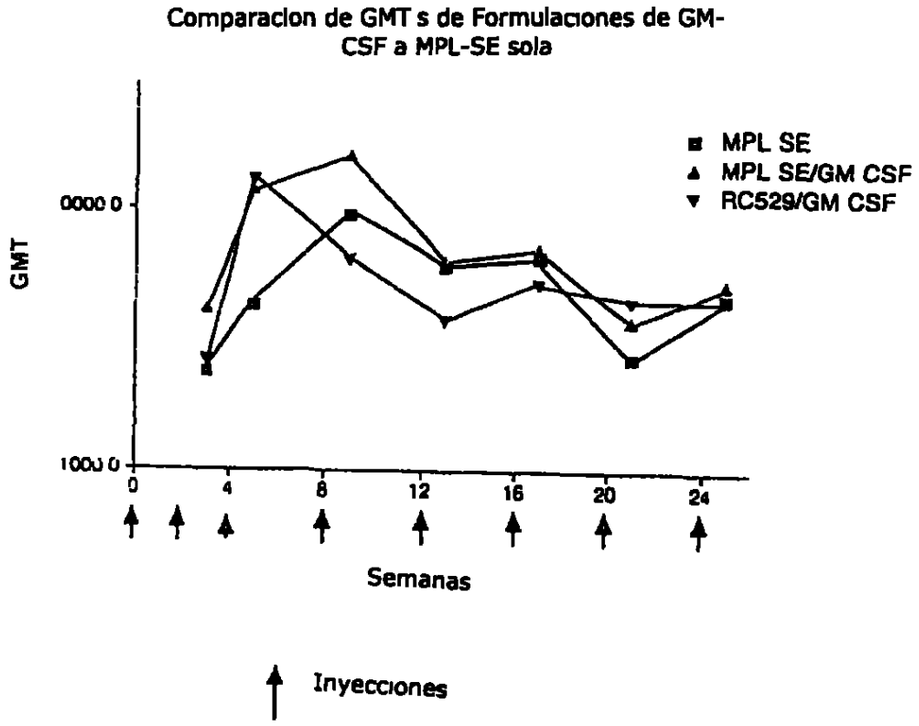
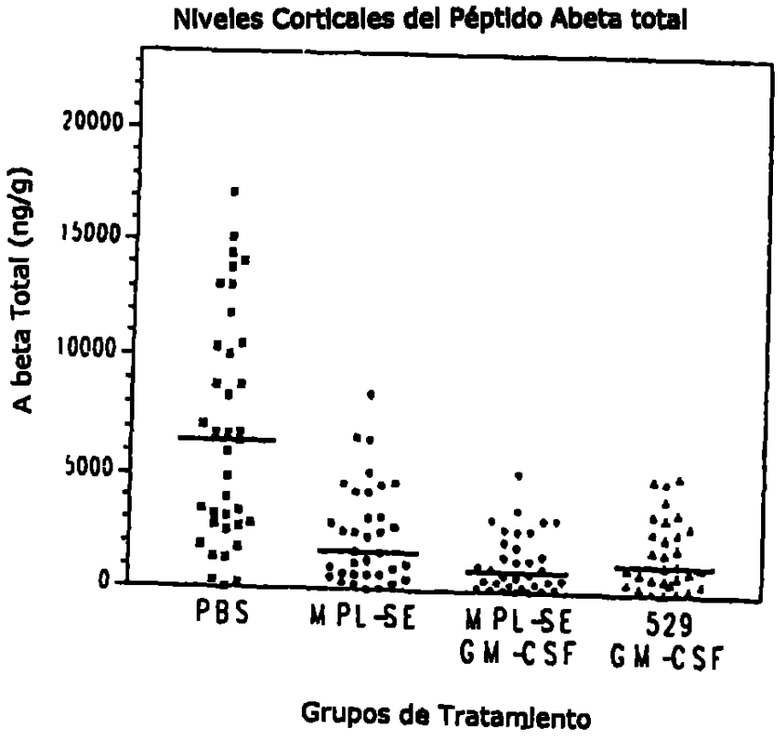

Comparacion de GMT s de Formulaciones de GM-CSF a MPL-SE sola
MPL SE
MPL SE/GM CSF
RC529/GM CSF
GMT
0000 0
1000 0
0
4
8
12
16
20
24
Semanas
Inyecciones

Figura 2


Niveles Corticales del Péptido Abeta total
A beta Total (ng/g)
20000
15000
10000
5000
0
PBS
MPL-SE
MPL-SE GM-CSF
529 GM-CSF
Grupos de Tratamiento

A42
139

Figura 3

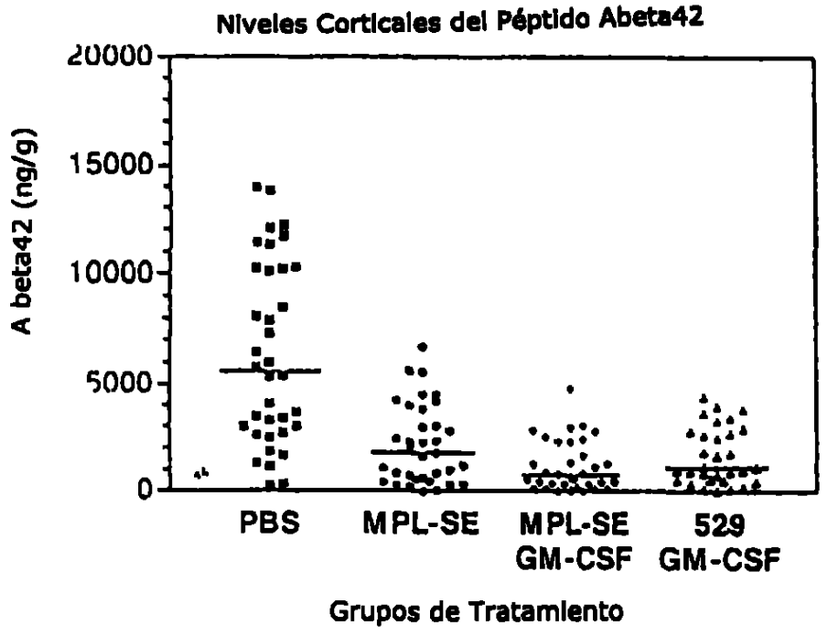


Figura 4

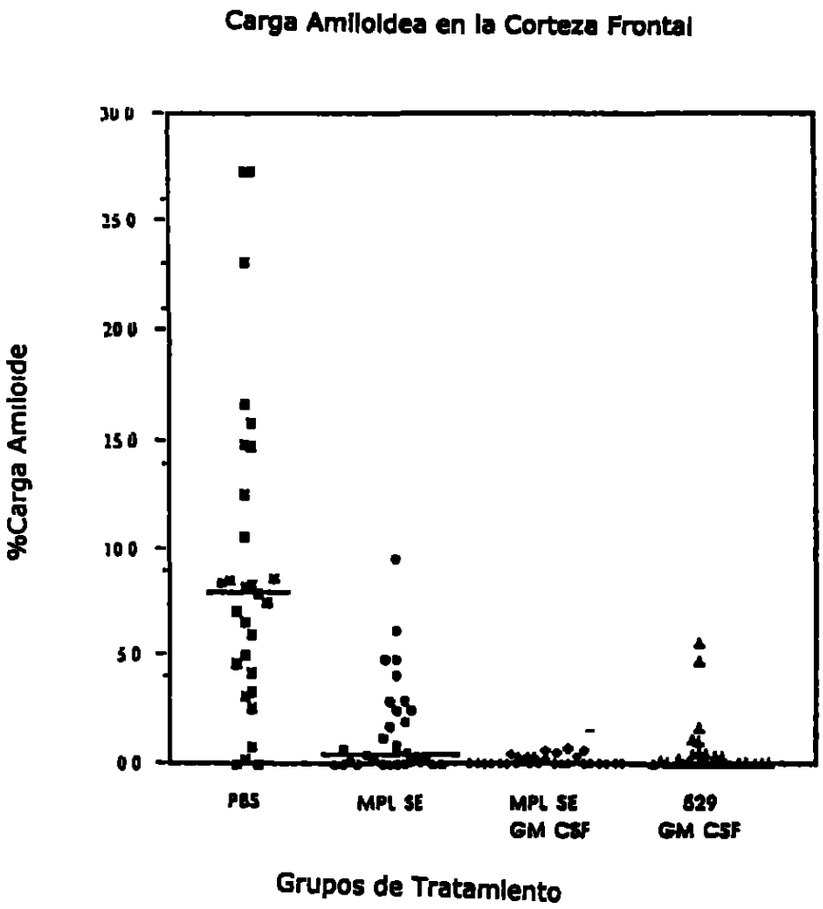

Carga Amiloidea en la Corteza Frontal
%Carga Amiloide
300
250
200
150
100
50
00
PBS
MPL SE
MPL SE GM CSF
829 GM CSF
Grupos de Tratamiento

Figura 5

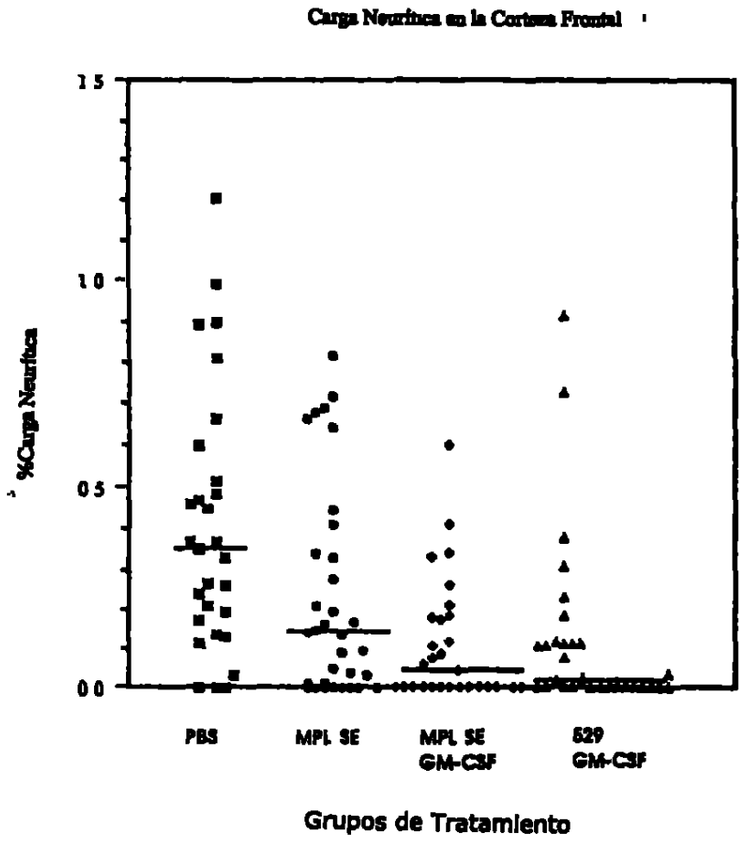

Carga Neurítica en la Corteza Frontal
1 5
1 0
0 5
0 0
% Carga Neurítica
PBS
MPL SE
MPL SE GM-CSF
529 GM-CSF
Grupos de Tratamiento

Figura 6

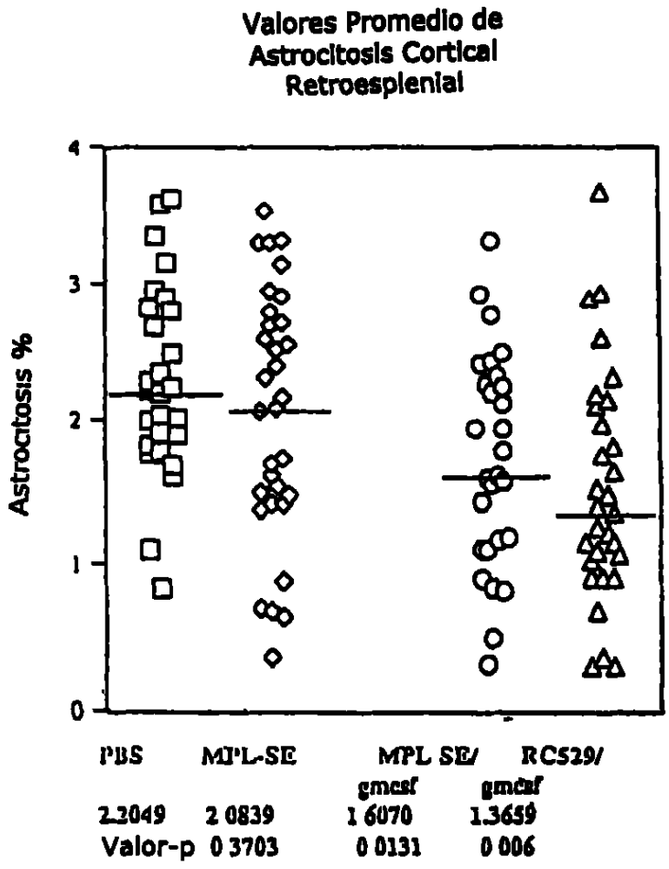

Valores Promedio de
Astrocitosis Cortical
Retroesplenial
Astrocitosis %
4
3
2
1
0
PBS
MPL-SE
MPL SE/ gmcsf
RC529/ gmcsf
2.2049
2 0839
1 6070
1.3659
Valor-p
0 3703
0 0131
0 006

Figura 7

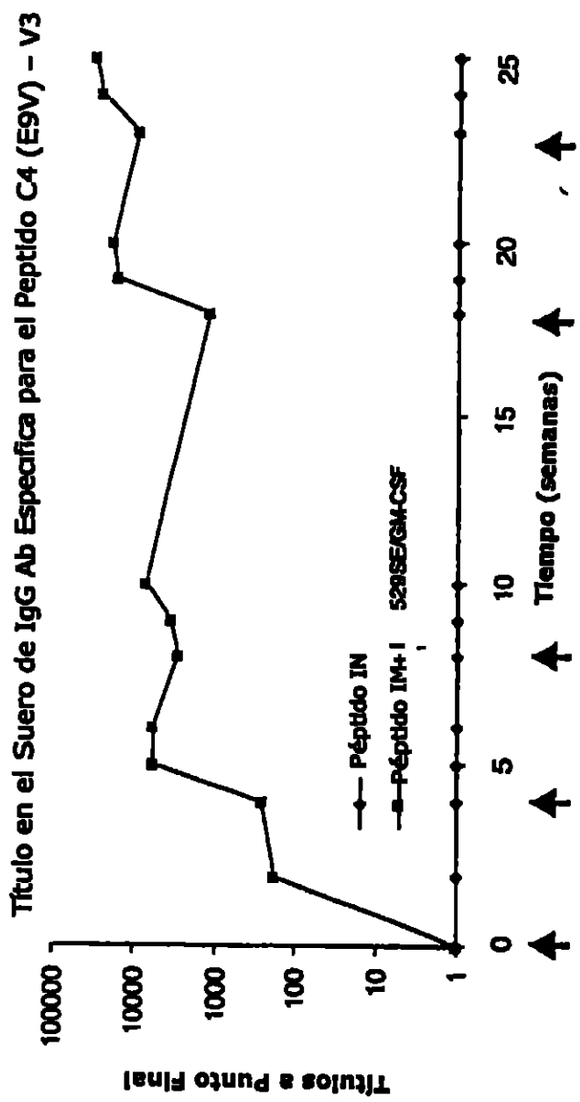
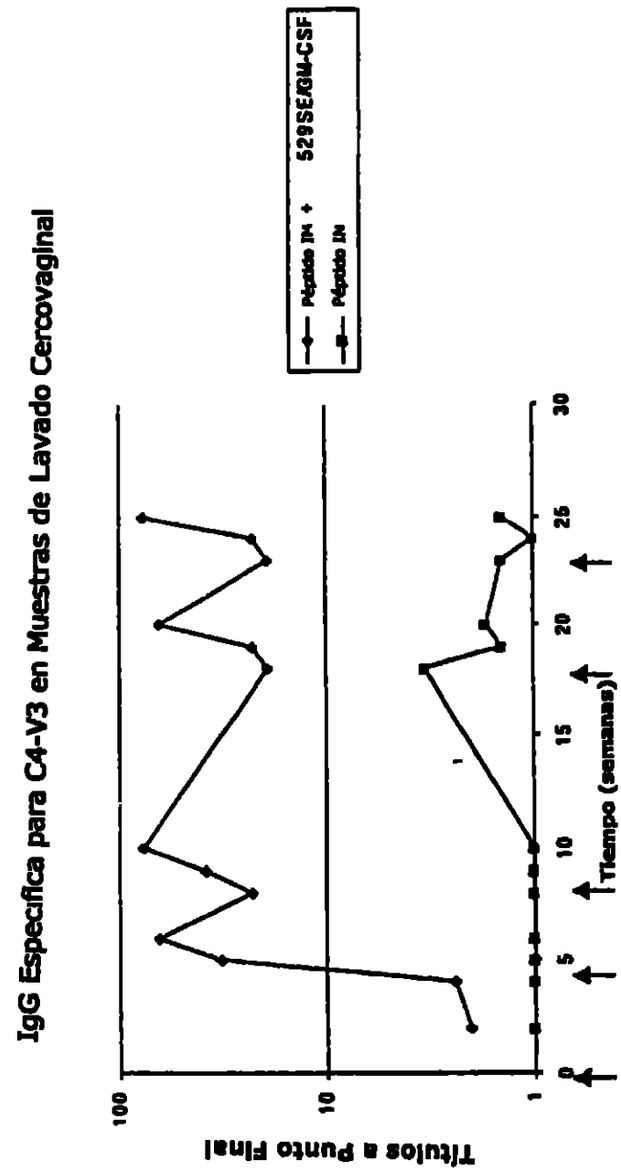
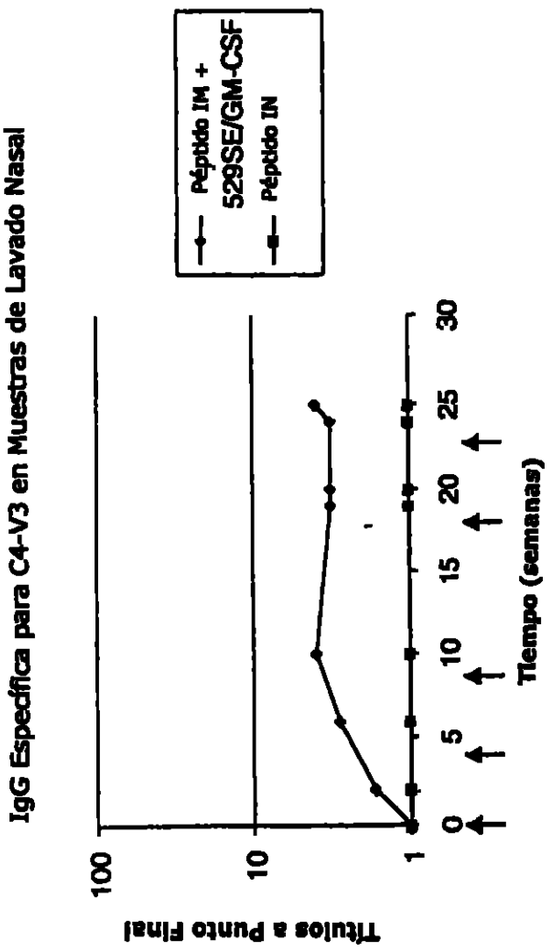

Título en el Suero de IgG Ab Específica para el Peptido C4 (E9V) - V3
Péptido IN
Péptido IM+I
529SEGM-CSF
Tiempo (semanas)
Títulos a Punto Final
100000
10000
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25

Figura 8


IgG Específica para C4-V3 en Muestras de Lavado Cervovaginal
Péptido IN + 529SEA/GM-CSF
Péptido IN
Títulos a Punto Final
100
10
1
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (semanas)

148
145

Figura 9



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> American Cyanamid Company

<120> Formulaciones de Combinación de adyuvantes

<130> AM100449PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3 1

<210> 1
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 1

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro
20 25 30

Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
35 40

<210> 2
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 2

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly
20 25 30

Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
35

<210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 3

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu
1 5 10 15

Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu
20 25

<210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 4

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly
20 25 30

Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 5

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
5 10 15

Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly
20 25 30

Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg
35

<210> 6
<211> 42
<212> PRT
<213> Fragmento Interno de la Proteína Precursora Amiloide

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> Fragmento Interno de la Proteína Precursora Amiloide

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial del virus de Inmunodeficiencia Humana

<400> 8

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile
5 10

150
149

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicacion de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- Descripcion de la invencion [X] 30
- Dibujos de ser estos pertinentes [X] 140
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [X] 2,3

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISENO INDUSTRIAL [ ]

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representacion gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicacion de que se solicita el registro de un Esquema de trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [ ]
- Representación gráfica del esquema de trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 93938667 Folios: 151
Fecha (AAS) 2003-05-05 17 01:38
Tramite 311 PCT PATENT 373 PAGE DOC. 411 F ESCRITAS
Dependencia 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Fecha

Carrera 13 No 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador 334 12 21-2-3-4
Fax 281 31 25 e-mail info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D C. Colombia

154
150

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D C ,

Doctor
Jose Antonio Lloreda
Apoderado
WYETH Holdings Corporation

Oficio N°
09517

ASUNTO	Radicación N°	03-038667
	Solicitud Internacional	PCT/US 2001/46943
	Fecha Inicio fase nacional	10/06/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento el el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486)

- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica N° 10 de 2001

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 31 OCT 2003

202092